



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

**Proteínas relevantes en la homeostasis
de metales pesados en el
hongo oportunista *Fusarium oxysporum***

Dámaris Lorenzo Gutiérrez

**TESIS DOCTORAL
2019**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Proteínas relevantes en la homeostasis de
metales pesados en el hongo oportunista
*Fusarium oxysporum***

Dámaris Lorenzo Gutiérrez

TESIS DOCTORAL

Dirigida por los Doctores: Javier Capilla Luque,

Loida López Fernández

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat Rovira i Virgili

Reus 2019

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES
UNITAT DE MICROBIOLOGIA
Carrer Sant Llorenç, 21
43201 Reus - Tarragona - Spain
Tel. 977 759 350 - Fax 977 759 322

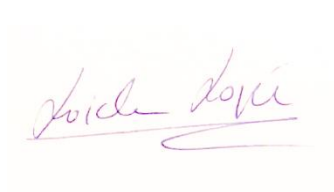
HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado “**Proteínas relevantes en la homeostasis de metales pesados en el hongo oportunista *Fusarium oxysporum***”, que presenta **Dámaris Lorenzo Gutiérrez** para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Ciencias Médicas Básicas de esta universidad.

Reus, 30 de Diciembre de 2019

Los directores de la tesis doctoral



Javier Capilla Luque



Loida López Fernández

*“El hombre fue capaz de hacerse científico
porque presuponía ver a Dios en la naturaleza. Y
presuponía leyes en la naturaleza porque creía en
un dador de leyes.”*

Alfred North Whitehead (matemático y filósofo inglés)

ÍNDICE GENERAL

Abstract.....	1
Resumen	5
1. Introducción	9
1.1. El género <i>Fusarium</i>	11
1.2. Fusariosis	15
1.3. <i>Fusarium oxysporum</i>	18
1.4. El papel de metales esenciales en los organismos	21
1.4.1. Hierro	23
1.4.2. Zinc	23
1.4.3. Cobre	24
1.4.4. Cadmio.....	25
1.5. Metales y patogénesis fúngica.....	26
1.6. Homeostasis de metales pesados relevantes en hongos.....	28
1.6.1. Homeostasis del Zinc	28
1.6.2. Homeostasis del Cobre	29
1.7. Proteínas de detoxificación de metales.....	32
1.7.1. Exportadoras de Cu ATPasas tipo P _{1B}	32
1.7.2. Metalotioneínas	34
2. Hipótesis	39
3. Objetivos	43
4. Materiales y métodos	47
4.1. Materiales	49
4.1.1. Organismos usados	49
4.1.2. Medios de cultivo	49
4.1.3. Oligonucleótidos sintéticos	50
4.1.4. Vectores de clonación	51
4.1.5. Programas de análisis de datos	52

4.2. Métodos.....	53
4.2.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos	53
4.2.2. Estudios in silico.....	54
4.2.3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos	55
4.2.4. Electroforesis de ácidos nucleicos.....	57
4.2.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	58
4.2.6. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos	58
4.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa.....	59
4.2.8. Transcripción reversa del ARN (RT-PCR)	61
4.2.9. Transformación genética	62
4.2.10. Transformación genética de <i>F. oxysporum</i>	63
4.2.11. Construcción de cepas mutantes de <i>F. oxysporum</i>	65
4.2.12. Hibridación y detección de ácidos nucleicos	66
4.2.13. Inducción de <i>F. oxysporum</i> en presencia de metales pesados... ..	68
4.2.14. Clonación de FoxyMt1 y subclonación en vector de expresión.....	68
4.2.15. Manipulación de proteínas	70
4.2.16. Inmunización en animales	75
4.2.17. Titulación de sueros policlonales.....	76
4.2.18. Fraccionamiento subcelular.....	76
4.2.19. Caracterización fenotípica de mutantes.....	77
4.2.20. Modelos de infección.....	78
4.2.21. Estadística	81
4.2.22. Microscopía.....	82
5. Resultados	83
5.1. Role of the <i>Fusarium oxysporum</i> metallothionein Mt1 in resistance to metal toxicity and virulence	87
5.2. Copper transporter protein CrpF protects against copper-induced toxicity in <i>Fusarium oxysporum</i>	104
5.3. Metal binding preferences of <i>Fusarium oxysporum</i> metallothionein FoxyMT1 and its subcellular localization	148

6. Discusión	174
6.1. El genoma de <i>F. oxysporum</i> codifica una única hipotética metalotioneína	176
6.2. Inducción de <i>mt1</i> por metales o estrés oxidativo	178
6.3. <i>mt1</i> en virulencia.....	179
6.4. MT1 se localiza principalmente en fracciones enriquecidas en retículo endoplásmico (RE) y membrana plasmática	180
6.5. Transportadores de cobre (Cu) en <i>F. oxysporum</i>	181
6.6. Inducción de <i>crpF</i> por metales o estrés oxidativo	183
6.7. <i>crpF</i> en virulencia	183
7. Conclusiones	186
7.1. Conclusions	190
8. Referencias	194

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i>	12
Figura 2. Árbol filogenético de la familia <i>Nectriaceae</i>	13
Figura 3. Resumen del ciclo de vida generalizado de <i>Fusarium</i>	14
Figura 4. Fusariosis vascular en el tomate.....	19
Figura 5. Homeostasis del Zinc en hongos.....	29
Figura 6. Homeostasis del Cobre en hongos.....	31
Figura 7. Esquema del constructo para MT1.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metalotioneínas fúngicas caracterizadas.....	37
Tabla 2. Material biológico empleado.....	49
Tabla 3. Oligonucleótidos específicos de <i>F. oxysporum</i>	50
Tabla 4. Oligonucleótidos específicos del vector de clonación pGem®T.....	51
Tabla 5. Vectores utilizados.....	51
Tabla 6. Programas para el análisis de datos.....	52
Tabla 7. Condiciones de amplificación para PCR.....	59
Tabla 8. Condiciones de amplificación para qPCR.....	60
Tabla 9. Stock metales pesados.....	77

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario sintetizado a partir del ARN mensajero

ADNg: ADN genómico

ADNp: ADN plasmídico

ADNr: ADN ribosómico

ARE: Elemento de Respuesta Antioxidante (del inglés: Antioxidant Response Element)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATA: Ácido aurín-tricarboxílico, del inglés ("AurinTricarboxylic Acid")

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Cys: Cisteína

Da: Dalton

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAasa: Enzima desoxirribonucleasa

dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato (del inglés: deoxyNucleotide TriPhosphate)

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

ESI-MS: Espectrometría de Masas de Ionización por Electro spray

Hyg^R: Casete de resistencia a higromicina

ICP-AES: Espectroscopía de Emisión Atómica de Plasma Acoplado por Inducción

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactosido

kb: Kilobase(s)

kDa: Kilo Daltons

LA: (Medio) Luria-Bertani agar

LB: (Medio) Luria-Bertani Broth

M: Marcador de peso molecular

MM: Medio mínimo

MRE: Elemento de Respuesta a Metales (del inglés: Metal Response Element)

MT(s): Metalotioneína (s)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ORF (ORFs): Marco (s) abierto (s) de lectura (del inglés, Open reading frame)

PAGE: Electroforesis en gel de Poliacrilamida

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction)

PDA: Medio sólido de extracto de patata, D-glucosa y agar (del inglés, "Potato Dextrose Agar")

PDB: Medio líquido de extracto de patata y D-glucosa (del inglés, "Potato Dextrose Broth")

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno (del inglés: Reactive Oxygen Species)

rpm: revoluciones por minuto

TA: temperatura ambiente (del inglés: Room Temperature)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SDS: Dodecilsulfato sódico

WB: Western Blot

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido

Abstract

Metallothioneins (MTs) are intracellular low-molecular-weight proteins rich in cysteines which possess high metal-binding capabilities. Recent studies have shown that MTs could have a significant role in pathogenic fungi virulence.

Few studies have investigated these proteins in pathogenic fungi and, therefore, the aim of this study was to identify and characterize proteins involved in heavy metal detoxification in *Fusarium oxysporum* and to determine their contribution to virulence in this phytopathogenic species. Therefore, knockout mutants were generated for genes encoding a hypothetical MT1 (*mt1*, FOXG_02862) and a hypothetical copper exporter ATPase (*crpF*, FOXG_03265).

Gene expression analysis showed high *mt1* induction under Zn exposure. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analysis also revealed preferential Zn binding to metallothionein. Cu presence, however, significantly increased *crpF* expression levels, confirming its function as a copper transporter.

$\Delta mt1$ and $\Delta crpF$ strains exhibited lower tolerance to Cd, Cu and Zn than the wild-type (wt) strain. The lack of *mt1* did not affect *F. oxysporum* pathogenic capacity, analyzed in infection models in tomato plants and systemic infection in mice. However, *mt1* deletion led to reduced resistance to macrophage killing in murine models. On the other hand, *crpF* deletion produced a two-fold increase in the mean survival time of infected plants compared with the wt strain.

In conclusion, a new hypothetical Zn metallothionein (MT1) and a Cu exporter have been characterized for *F. oxysporum*, a phytopathogenic and opportunistic fungus with clinical relevance.

Resumen

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas intracelulares de bajo peso molecular ricas en cisteínas que poseen una elevada capacidad de unión a metales pesados. Estudios recientes han indicado que las MTs pueden tener un papel significativo en la virulencia de hongos patógenos.

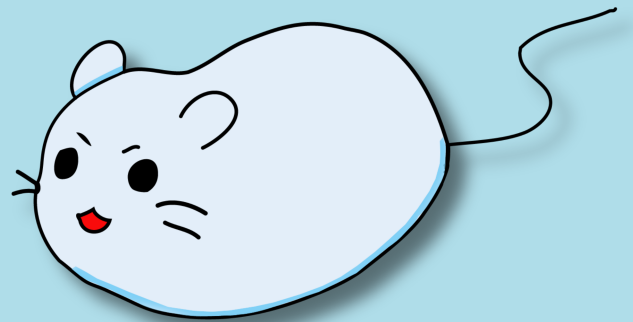
A día de hoy, son escasos los estudios relacionados con estas proteínas en hongos patógenos, es por ello que el presente trabajo tiene por objetivo identificar y caracterizar proteínas involucradas en la detoxificación de metales pesados en *Fusarium oxysporum*, y determinar su contribución en la virulencia de esta especie fitopatógica. Para ello se generaron mutantes defectivos en los genes codificantes de una hipotética MT (*mt1*, FOXG_02862) y una hipotética ATPasa exportadora de cobre (*crpF*, FOXG_03265) presentes en el genoma de *F. oxysporum*.

Los estudios de expresión génica demostraron una elevada inducción de la expresión de *mt1* en presencia de Zn y esta predilección por el Zn se corroboró mediante espectrometría de masas por electrospray (ESI-MS). La presencia de Cu, en cambio, incrementó significativamente los niveles de expresión de *crpF*, lo cual confirma su función como transportador de dicho metal.

Las cepas mutantes $\Delta mt1$ y $\Delta crpF$ mostraron menor tolerancia al Cd, Cu y Zn, en comparación a la cepa silvestre (wt). La ausencia de *mt1* no afectó a la capacidad patogénica de *F. oxysporum*, analizada en modelos de infección en planta de tomate y de infección sistémica en ratones. Sin embargo, la delección de *mt1* causó una reducción de la resistencia a la fagocitosis de macrófagos murinos. Por otro lado, la delección de *crpF* aumentó el doble el tiempo de supervivencia medio de las plantas infectadas respecto a las cepas wt.

En conclusión, se han caracterizado una nueva hipotética metalotioneína (MT1) de Zn en un hongo de importancia clínica y fitopatológico, así como una hipotética exportadora de Cu.

1. INTRODUCCIÓN



1.1. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un heterogéneo grupo de hongos filamentosos saprófitos ampliamente distribuidos en casi todos los ecosistemas terrestres y caracterizados por una elevada capacidad de dispersión y de crecimiento en sustratos orgánicos. Este género es conocido por su capacidad fitopatogénica que afecta a gran variedad de cultivos. Además, es productor de micotoxinas lo que contribuye a causar daño en animales y humanos, siendo un importante patógeno oportunista humano (Nelson *et al.*, 1994).

El género *Fusarium* está clasificado taxonómicamente dentro de la familia *Nectriaceae*, orden *Hypocreales* y la clase *Sordariomycetes* del filo *Ascomycota*. Fue propuesto por Link en 1809 (Link, 1809) para describir hongos con conidios en forma de banana o canoa; desde esa fecha y durante los siguientes 100 años, más de 1000 especies fueron descritas. En 1935, Wollenweber y Reinking lo reclasificaron en 16 secciones y 135 especies (Wollenweber *et al.*, 1935). Sin embargo, a lo largo del tiempo la clasificación taxonómica de *Fusarium* ha variado muchísimo. En estos sistemas se prestó más atención a la evaluación cuidadosa de las características morfológicas, por ejemplo; las células conidiógenas, macro y microconidios, y las clamidosporas, teniendo en cuenta la variación dentro de las especies documentada por Snyder y Hansen (Snyder *et al.*, 1940).

Por tanto durante muchos años la clasificación de *Fusarium* fue basada principalmente en la morfología de las estructuras reproductivas asexuales; como las clamidosporas (estructuras de pared más gruesa, que suelen resistir condiciones adversas), fiálides (células conidiógenas) y sus micro- y macroconidios (esporas asexuales), así como también en las características del cultivo *in vitro*; como son la textura de las colonias, el color y el aroma (Figura 1) (Gordon *et al.*, 1997; Llorens *et al.*, 2006).



Figura 1. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. A. Colonias en agar patata-dextrosa. B. Macroconidios. C. Microconidios. D. Fiálides (indicadas con flechas). E. Clamidosporas (indicadas con flechas). Escala de B-E = 10 μ m. Adaptado de (Maryani *et al.*, 2019).

En la actualidad los criterios morfológicos para la identificación y clasificación de las diferentes especies de *Fusarium* se complementan con el análisis de secuencias de ADN de genes conservados evolutivamente, permitiendo un importante avance en la taxonomía de este género. Para la identificación de las distintas *Fusarium* spp. son útiles los siguientes genes: ARN polimerasa subunidad I (*rpb1*) (O'Donnell *et al.*, 2010), ARN polimerasa subunidad II (*rpb2*) (O'Donnell *et al.*, 2010), factor de elongación 1-alfa (*tef1*) (Carbone *et al.*, 1999; O'Donnell *et al.*, 1998), β -tubulina (Tooley *et al.*, 2001) y ADN ribosomal (ADNr) (Watanabe *et al.*, 2011). Dentro del ADNr se incluyen la terminación 3' del ADNr 18S, la región espaciadora intergénica transcrita 1 (ITS1), el ADNr 5.8S y la terminación 5' del ADNr 28S.

Debido a la complejidad del género, muchas de sus especies han sido agrupadas en complejos de especies ("*species complex*") permitiendo así agrupar aquellos taxones que habían sido definidos de manera infra-específica, como "*formae specialis*" (*f. sp.*) en base a sus características fitopatogénas. Por ejemplo, uno de estos complejos de especies con el mayor número de "*formae specialis*" corresponde a *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) (Leslie *et al.*, 2006). De esta manera se han definido aproximadamente 20 complejos de especies en *Fusarium*, como por ejemplo *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC), *F. chlamydosporum* species complex (FCSC), *F. dimerum* species complex (FDSC) (O'Donnell *et al.*, 2009). Es así también como actualmente basados en los últimos cambios

taxonómicos, el conocido e importante grupo de especies *Fusarium solani* species complex (FSSC) ha sido cambiado al género *Neocosmospora*, en base a caracteres morfológicos pero sobre todo, en base a los análisis filogenéticos en este grupo de hongos (Figura 2) (Lombard *et al.*, 2015).

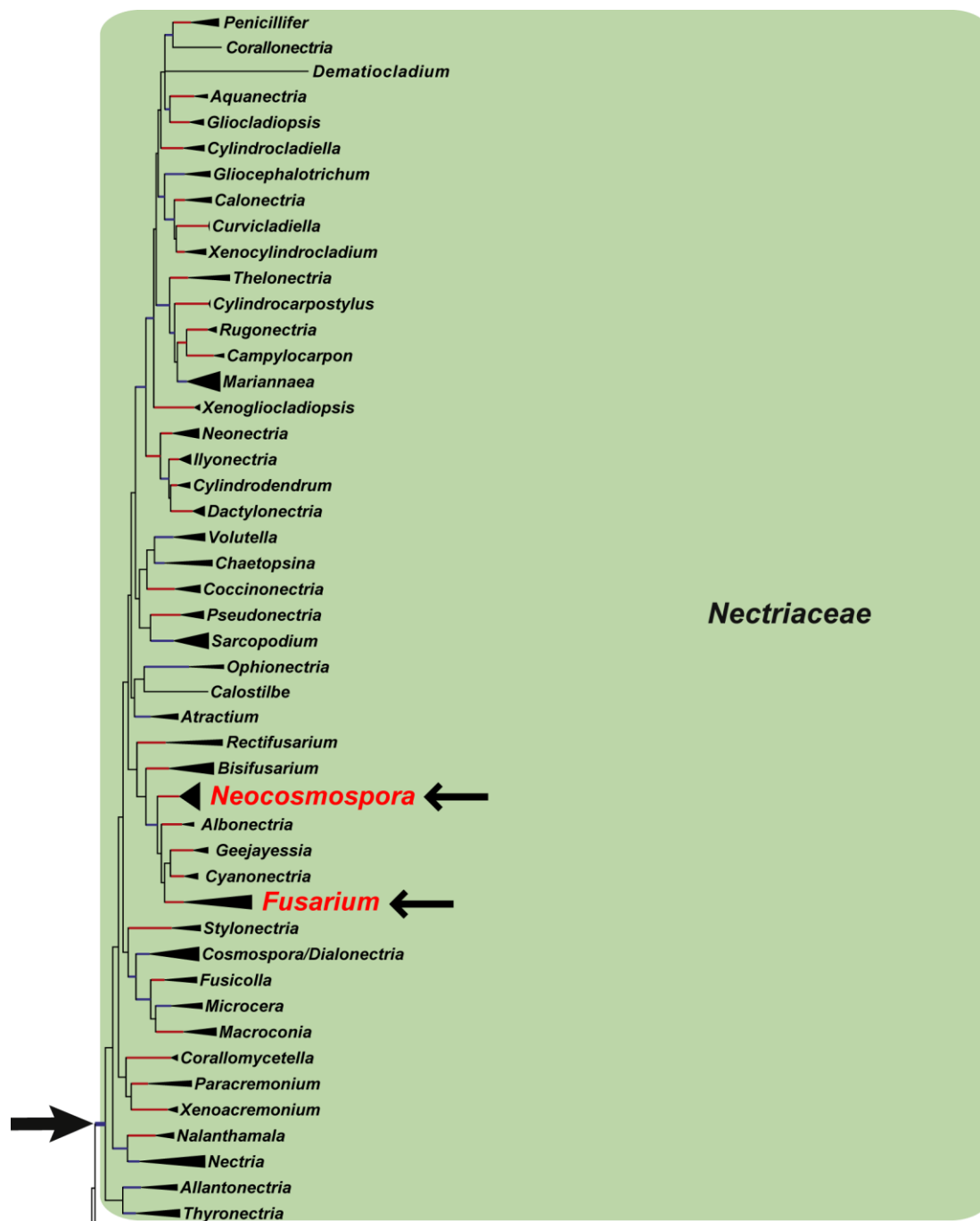


Figura 2. Árbol filogenético de la familia *Nectriaceae*. Indicado con flechas y en rojo la separación de las especies del antiguo FSSC al género *Neocosmospora*. Adaptado de (Lombard *et al.*, 2015).

Las cepas de *Fusarium* forman macroscópicamente, un micelio de textura algodonosa de color blanco, aunque puede variar desde rosa pálido hasta púrpura oscuro, dependiendo generalmente de las condiciones ambientales. Estas pueden influir en su velocidad de crecimiento, forma, tamaño y abundancia de sus conidios, así como en el número de septos de sus macroconidios, entre otras características morfológicas (Booth, 1971). Las especies de este género se caracterizan por presentar microscópicamente estructuras de reproducción asexual conocidas como conidios. De acuerdo al tamaño de los conidios podemos distinguir macroconidios, de mayor longitud, generalmente multiseptados, en forma de huso y que se encuentran principalmente cuando la cepa forma estructuras de reproducción mitótica conocidas como esporodóquios, y microconidios, que son de menor tamaño, unicelulares o bicelulares, y terminales o en cadena generados directamente a partir de conidióforos (estructuras de reproducción asexuales que emergen desde una hifa) (Fig. 3). Además, la mayoría de las especies son capaces de producir clamidosporas y sólo algunas presentan también un ciclo de reproducción sexual con formación de ascosporas (Burnett, 1984; Gordon, 2017).

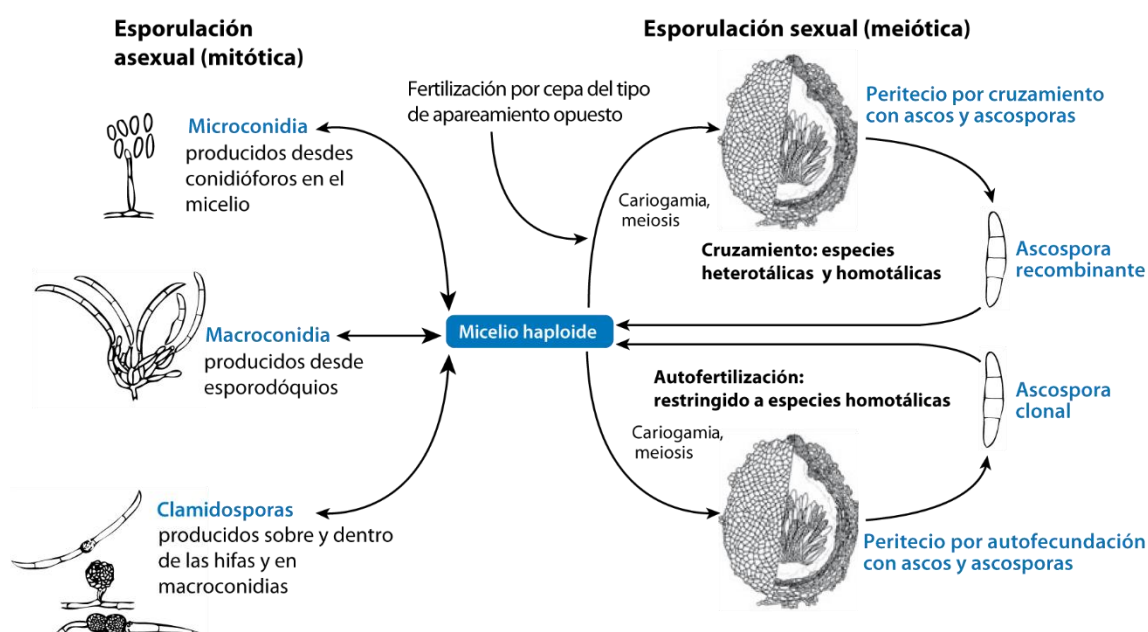


Figura 3. Resumen del ciclo de vida generalizado de *Fusarium*. Adaptado de (Ma *et al.*, 2013).

Fusarium crece como una colonia de hifas haploides, excepto por un breve estado dicariótico (en el que cada célula contiene dos núcleos haploides parentales) seguido de etapas diploides que preceden a la meiosis y a la producción de esporas sexuales haploides (ascosporas) (Ma *et al.*, 2013). Las ascosporas son producidas en grupos

de ocho, en ascos (sacos) dentro de un cuerpo fructífero en forma de botella denominado peritecio. Algunas especies del género *Fusarium* son capaces de autofecundarse, pero estas se corresponden estrictamente a aquellas que son homotáticas y son capaces de producir una progenie de ascosporas clonales (apomixis). Tanto las especies heterotáticas (que son infértiles por sí solas) como las homotáticas pueden tener un tipo de apareamiento cruzado ("*mating type*") y de esta manera formar estructuras de reproducción sexual (Fig. 3) (Ma *et al.*, 2013).

1.2. Fusariosis

El género *Fusarium* es un importante fitopatógeno que causa grandes pérdidas económicas en cultivos en todo el mundo. La revista "Molecular Plant Pathology" recopiló estudios de unos 495 patólogos fúngicos que elaboraron una lista de los 10 principales fitopatógenos fúngicos más importantes científica y económicamente (Dean *et al.*, 2012). Curiosamente, varios de los hongos de esta lista son aquellos que infectan los cultivos de cereales, lo cual no es sorprendente ya que los cereales como el trigo y el arroz son algunos de los cultivos más producidos en todo el mundo. En esta lista se incluyen dos especies de *Fusarium*, *F. graminearum* y *F. oxysporum*.

La fusariosis del trigo (*Fusarium* head blight, FHB) es una enfermedad fúngica que afecta a los cultivos de cereales, particularmente trigo, cebada, maíz y avena (Wilson *et al.*, 2018). Esta patología puede ser causada por diferentes especies de *Fusarium*, pero los mayores costes económicos se deben a *F. graminearum* debido a su naturaleza mucho más agresiva que resulta en pérdidas de rendimiento. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos clasifica a FHB como la peor enfermedad que ha afectado a las plantas en EE.UU. desde las epidemias de roya (*Puccinia graminis*) en la década de 1950. Desde 1990, los agricultores de trigo y cebada en EE.UU. han perdido más de 3 mil millones de dólares debido a las epidemias de FHB. Canadá también ha experimentado graves pérdidas desde 1990. La fusariosis vascular o marchitez vascular ("*Fusarium* wilt") es una fitopatología producida por *F. oxysporum* que será abordada en el apartado dedicado a este complejo de especies (apartado 1.3.).

Algunas especies de *Fusarium* actúan como patógenos oportunistas, tanto para el hombre como para los animales y las infecciones que producen reciben el nombre de fusariosis, pudiendo ser desde superficiales (queratitis, onicomicosis), localmente invasivas (celulitis, sinusitis, intertrigo), profundas o diseminadas, estas últimas se suelen presentar en pacientes inmunocomprometidos (Nelson *et al.*, 1994; Tupaki-Sreepurna *et al.*, 2018). Actualmente, la fusariosis forma parte de las infecciones

fúngicas más frecuentes, con una elevada incidencia en pacientes hematológicos y trasplantados de células madre hematopoyéticas, siendo la neutropenia uno de los principales factores predisponentes (Nucci *et al.*, 2007; Nucci *et al.*, 2004). Las cepas de *Fusarium* pueden penetrar en el cuerpo por contacto con el suelo o el agua a través de pequeños cortes o abrasiones en la piel o mucosas, pudiendo así producir onicomycosis o infecciones locales invasivas en la piel (celulitis, paroniquia e intertrigo digital), éstas últimas más comunes en pacientes diabéticos (Vennewald *et al.*, 2005). Se ha aislado agua contaminada con algunas especies de *Fusarium*, en piscinas, desagües de duchas y en los sistemas de aguas de los hospitales y ésta se considera otra vía de infección, entre pacientes hospitalizados inmunocomprometidos (Short *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2013). *Fusarium* puede causar también alergias, como por ejemplo, sinusitis, en pacientes inmunocomprometidos (Wickern, 1993) y otras especies de *Fusarium* son capaces de producir micotoxicosis, tanto en humanos como en animales después de la ingesta de alimentos contaminados por *Fusarium* (Kokkonen *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 1994).

La incidencia de fusariosis en Europa se ha mantenido estable en los últimos 20 años. Sin embargo, en Estados Unidos un estudio retrospectivo en un centro de referencia de neoplasias hematológicas concluyó que la fusariosis aumentó significativamente de 0,5 a 3,8 casos por año de 1975 a 1995 (Boutati *et al.*, 1997; Dignani *et al.*, 2004). En otra institución de EE. UU. se documentaron 31 casos de fusariosis invasiva entre 5589 receptores de trasplante de células madre (0,55 %) durante un período de 14 años, con un aumento en el número de estos pacientes a fines de la década de 1990 (Marr *et al.*, 2002).

Alrededor del 40 % de los casos reportados de fusariosis pertenecen al complejo FSSC (*Fusarium solani* species complex) mientras que las infecciones causadas por el complejo FOSC (*Fusarium oxysporum* species complex) representa un 20 % (van Diepeningen *et al.*, 2014). Otro complejo importante de *Fusarium* encontrado en los aislados con relevancia clínica es el complejo de especies *Gibberella fujikuroi* (Nucci *et al.*, 2007). En tres estudios realizados sobre infecciones fúngicas en la piel y onicomycosis (en Suiza, Italia y Colombia) se concluyó que del 31 % al 82 % de los agentes causales pertenecían al complejo FSSC y entre el 4 % y 56 % al complejo FOSC, mientras que miembros del complejo *Gibberella fujikuroi* species complex (FFSC) presentaron una incidencia del 2 % al 37 % (Castro Lopez *et al.*, 2009; Migheli *et al.*, 2010; Ninet *et al.*, 2005). Aunque el principal agente causal de las onicomycosis es *Candida* o los dermatofitos, se ha observado un incremento en las especies de

Fusarium que va del 10 al 15 % (van Diepeningen *et al.*, 2014; van Diepeningen *et al.*, 2015).

Los métodos de cultivo y la microscopía son las herramientas de rutina de los laboratorios clínicos para identificar las diferentes especies de *Fusarium*, sin embargo, métodos más rápidos, sofisticados y efectivos para identificar las muestras de este género podrían mejorar el resultado para el paciente. Estos enfoques diagnósticos más efectivos incluyen ensayos serológicos y ensayos de PCR anidada específicos que pueden dar valores predictivos positivos y negativos por encima del 90 % (Muhammed *et al.*, 2011; van Diepeningen *et al.*, 2015). La espectrometría de masas MALDI-TOF es una herramienta emergente para una rápida identificación y clasificación de las diferentes *Fusarium* spp. cultivadas en función de sus espectros de proteínas (van Diepeningen *et al.*, 2015).

El tratamiento de la fusariosis en pacientes inmunocomprometidos sigue siendo un desafío y el pronóstico de la fusariosis sistémica en esta población sigue siendo pobre. El tratamiento exitoso depende en gran medida de que especies particulares de *Fusarium* están involucradas en la infección. La Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) y la Confederación Europea de Micología Médica (ECMM) conjuntamente sugieren como tratamiento de referencia para combatir la fusariosis: la terapia temprana con voriconazol o con el complejo lipídico de amfotericina B (Tortorano *et al.*, 2014). En el caso de que se trate de fusariosis severa sería el tratamiento mencionado en conjunto con intervención quirúrgica para prevenir la diseminación.

Sin embargo, las *Fusarium* spp. a menudo son resistentes a muchos agentes antifúngicos (Azor *et al.*, 2009) y esta resistencia generalmente se asocia con perfiles de susceptibilidad antifúngica inherentemente diferentes, lo que hace que la identificación de *Fusarium* en el nivel de especie sea muy importante para un tratamiento óptimo.

En conclusión, la infección por *Fusarium* como patógeno oportunista es considerado un problema emergente que va en aumento el cual debe tenerse en consideración como causa relevante de infección fúngica sistémica en pacientes inmunocomprometidos y debe tratarse en consecuencia; además la fusariosis parece presentar diferencias en cuanto al agente causal según las áreas geográficas (van Diepeningen *et al.*, 2014).

Por lo tanto, un conocimiento mayor acerca de los genes que contribuyen a la virulencia, el metabolismo, los componentes de la pared celular y las vías de

señalización de este hongo dará una idea clara sobre los componentes celulares que podrían ser explotados como objetivos potenciales para compuestos que pueden servir clínicamente para tratamientos terapéuticos. Solo entonces el tratamiento de la fusariosis en pacientes inmunocomprometidos será más favorable.

1.3. *Fusarium oxysporum*

El actual complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC) ha sido considerado un importante fitopatógeno, desde que Snyder y Hansen definieron el concepto de “*formae specialis*” en 1940 (Snyder *et al.*, 1940) para referirse por ejemplo a cada aislado de *F. oxysporum* que tenía la capacidad de infectar una determinada especie, género o grupo vegetal. Por ejemplo, la cepa de *F. oxysporum* empleada en la presente tesis es patógena del tomate (*Lycopersicon esculentum*) y se denomina *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Hoy en día, el concepto de *formae specialis* sigue en uso y, aunque algunas infectan a un único hospedador, para otras el rango es más amplio y actúan sobre un grupo restringido de especies vegetales (Burnett, 1984).

Estudios moleculares recientes relacionan este fenómeno con la existencia de cromosomas específicos presentes exclusivamente en determinados genomas que son portadores de genes relacionados con patogénesis que confieren especificidad para el hospedador (Ma *et al.*, 2010). Por ejemplo, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* posee cuatro cromosomas únicos y singulares, de un total de quince. Estos cuatro cromosomas se caracterizan por presentar un alto número de elementos móviles y regiones variables, que confieren al hongo su capacidad patogénica específica y una elevada diversidad genética (3, 6, 14 y 15).

FOSC se propaga generalmente mediante dispersión de conidios por vía aérea transportados por el viento, estando presentes en la mayoría de ecosistemas terrestres (Agrios, 1997). Esta especie se encuentra comúnmente en el suelo, principalmente en forma de clamidospora o creciendo en restos de materia orgánica o exudados de raíces, pudiendo ser aislada también de la superficie de plantas con las que puede establecer relaciones saprofíticas o parasíticas (Beckman, 1987).

F. oxysporum causa fusariosis vascular (“*Fusarium wilt*”) en un amplio rango de plantas hospedadoras entre las que destacan, la planta del tomate, del melón, de la alubia, de la col, del tabaco, del boniato o del plátano, entre otros (Husaini *et al.*, 2018). Generalmente, las plantas adquieren la infección a través de sus raíces cuando éstas se desarrollan en suelos contaminados por esporas de *F. oxysporum*. La proximidad de masas radiculares induce la germinación de las esporas, favoreciendo su desarrollo y la penetración en el tejido vegetal (estado parasítico) (Beckman, 1987). *F. oxysporum*

es capaz de atravesar la epidermis de la planta sin necesidad de la presencia de estructuras especializadas, a diferencia de como sucede en otras especies del género, creciendo intra- e intercelularmente hasta llegar a los vasos del xilema, colonizando e invadiendo así las partes aéreas de la planta (fase patogénica) (Beckman, 1987). En estados avanzados de la enfermedad, el hongo se extiende fuera del sistema vascular produciendo conidios y clamidosporas, provocando así el marchitamiento e incluso la muerte de la planta hospedadora (Fig. 4).

La sintomatología más común incluye marchitez inicial y amarillamiento de las hojas, que ocurre típicamente después de la floración (Agrios, 1988; Durbin, 1989). A medida que la planta madura, presenta marchitez en algunos sectores y síntomas cloróticos en las hojas. A medida que la enfermedad progresa se observa marchitez pudiendo resultar en necrosis e incluso en la muerte de la planta. Esta sintomatología es muy similar a la causada por otras enfermedades vasculares, por lo que es necesario aislar e identificar el patógeno en el laboratorio.

La repercusión económica de la fusariosis vascular, junto con la capacidad de este complejo de especies de infectar de forma específica a un amplio número de especies vegetales, ha suscitado el interés del estudio de los mecanismos de infección, convirtiéndolo en un modelo para conocer mejor el proceso de patogénesis en hongos (Leslie *et al.*, 2006).

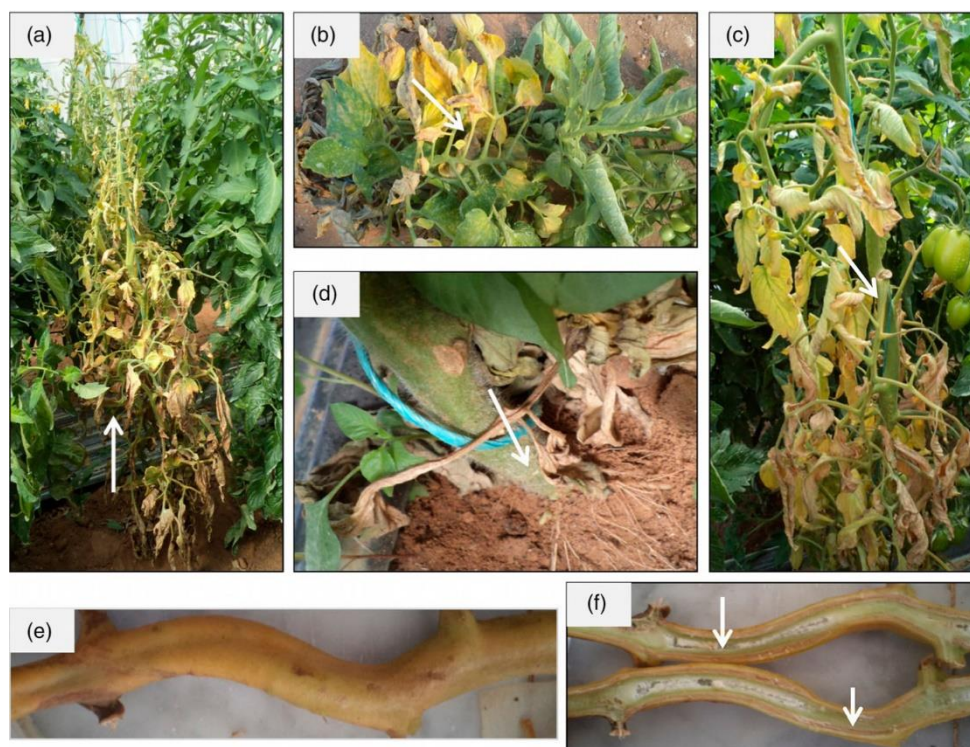


Figura 4. Fusariosis vascular en el tomate. A-C. Coloración amarillenta de las hojas inferiores. **D.** Signos libres de pudrición de la corona y raíz. **E.** Tallos descoloridos. **F.** Decoloración vascular marrón oscuro que se extiende más arriba de la sección longitudinal de los tallos decolorados. (Rania *et al.*, 2016).

Como ya se ha mencionado en el apartado de Fusariosis, las manifestaciones clínicas causadas por *Fusarium* van desde infecciones superficiales como queratitis u onicomycosis en individuos inmunocompetentes (Al-Hatmi *et al.*, 2016) a fusariosis diseminadas o profundas, las cuales se dan exclusivamente en pacientes inmunosuprimidos (Bhatt *et al.*, 2011).

F. oxysporum forma parte de los principales complejos de especies responsables de onicomycosis, junto a *F. solani* (Al-Hatmi *et al.*, 2015). La onicomycosis debe ser adecuadamente tratada debido al riesgo de diseminación desde una lesión en la uña local luego de aumentar la inmunosupresión (Verrier *et al.*, 2014). Clínicamente las infecciones de las onicomycosis por *Fusarium* son indistinguibles de las causadas por dermatofitos y se presentan como infecciones totalmente distróficas distales o proximales debajo de la uña (Bonifaz *et al.*, 2007; Ranawaka *et al.*, 2015). La paroniquia causada por *Fusarium* se asocia a menudo con onicomycosis y se caracteriza por una inflamación purulenta alrededor de la uña, similar a la inducida por las *Candida* spp. (Galletti *et al.*, 2015; Varon *et al.*, 2014).

Lo mismo que ocurre con otras fusariosis, la queratitis debida a *Fusarium* está principalmente causada por los complejos de especies de *F. solani* y *F. oxysporum* (Al-Hatmi *et al.*, 2014; do Carmo *et al.*, 2016). La queratitis por *Fusarium* es una de las causas más frecuentes de queratitis micótica y puede causar ceguera irreversible. La infección generalmente se desarrolla a partir de un traumatismo, especialmente con materia vegetal, lentes de contacto, cuerpos extraños o cirugía y es favorecida por el uso de antibióticos tópicos empíricos y esteroides (Ghosh *et al.*, 2016). Se caracteriza por inflamación, eritema conjuntival y una úlcera corneal central irregular, también se puede observar la existencia de leucocitos y fibrina en la cámara anterior del ojo ("Hipopion"), lesiones satélite y opacidad corneal (Ghosh *et al.*, 2016).

En las últimas dos décadas ha habido un aumento progresivo en la incidencia de infecciones invasivas por *Fusarium* en pacientes inmunocomprometidos. Los pacientes con mayor riesgo de presentar fusariosis son aquellos que presenten (Nucci *et al.*, 2014):

- Neoplasias hematológicas malignas
- Quimioterapia intensiva y/o régimen de corticosteroides
- Ser receptores de trasplante de órgano sólido o de células madre con una neutropenia prolongada y profunda de <500 células / mm³
- Una inmunodeficiencia severa de células T

Cabe decir también que entre la población de pacientes pediátricos la tercera y la cuarta causa más común de infecciones fúngicas invasivas se deben a los complejos de especies FSSC y FOSC, respectivamente (Al-Rezqi *et al.*, 2009; Georgiadou *et al.*, 2012).

Los factores ambientales también juegan un papel importante en el desarrollo de infecciones por este hongo, p. ej. la contaminación de los depósitos de agua ha sido la causa de brotes hospitalarios por *Fusarium* (Garnica *et al.*, 2015; Litvinov *et al.*, 2015). Los pacientes con fusariosis diseminada con frecuencia presentan afectación de los pulmones, hemocultivos positivos, lesiones cutáneas metastásicas y celulitis (Varon *et al.*, 2016). A pesar de los avances en la terapia y el diagnóstico temprano, la fusariosis invasiva se asocia a una alta morbilidad y a un porcentaje de mortalidad del 70 % (Ortoneda *et al.*, 2002).

1.4. El papel de metales esenciales en los organismos

Los organismos requieren cantidades variables de metales pesados y algunos de ellos, como el hierro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu), manganeso (Mn), molibdeno (Mo) o zinc (Zn), son indispensables para los humanos (Lane *et al.*, 2000). Sin embargo, todos los metales son tóxicos a concentraciones altas ya que pueden dañar irreversiblemente a las células (Chronopoulos *et al.*, 1997). Los metales pesados pueden actuar interrumpiendo las funciones metabólicas de dos maneras:

- a) Acumulándose y así interrumpiendo las funciones de órganos vitales y glándulas.
- b) Desplazando a otros metales esenciales y obstaculizando así su función biológica. Estos metales pesados que sustituyen a los esenciales pueden introducirse en los organismos mediante el consumo de alimentos o bebidas, por exposición de la piel o por inhalación (Lane *et al.*, 2005).

Diversas disciplinas han abordado estudios para determinar la composición química de los organismos y determinar la función de macrominerales y elementos traza. Son estos últimos, en los que se engloban los metales pesados, los más controvertidos, ya que, a pesar de su toxicidad, se sabe que son esenciales para diferentes funciones biológicas. (Emsley, 2011; Nieboer *et al.*, 1978). Se ha comprobado que la cantidad total de metales pesados presente en un ser humano de 70 kg es de aproximadamente 7 g, de los cuales 4 g son de hierro (Fe), 2,5 g de zinc (Zn), 0,12 g plomo (Pb) y 0,07 g cobre (Cu), (Maret, 2016).

Las funciones identificadas para los metales pesados esenciales hasta ahora son:

- El Fe y el Cu participan en el transporte, almacenamiento y uso de oxígeno y en la transferencia de electrones. El Cu es esencial en la respiración aeróbica de todos los eucariotas.
- El cobalto (Co) es un componente clave de la vitamina B₁₂ y participa en el metabolismo celular.
- El Zn es necesario para la función de más de 300 enzimas y 1000 factores de transcripción, y se almacena y transfiere mediante las metalotioneínas.
- El vanadio (V) actúa como cofactor de enzimas de algas marinas y el manganeso (Mn) también actúa como cofactor en diferentes enzimas de las siguientes familias, oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas, lectinas e integrinas.
- El cromo (Cr) participa en la utilización de glucosa ya que tiene un rol importante en la acción de la insulina.
- El níquel (Ni) se sabe que juega un papel importante en la biología de algunas plantas, eubacterias, arqueobacterias y hongos, además las enzimas que contienen Ni como la ureasa se consideran factores de virulencia en algunos organismos.
- El arsénico (As) forma parte de las enzimas bacterianas conocidas como arsenato reductasas.
- El Selenio (Se) tiene funciones antioxidantes y participa en la producción de hormonas.
- El molibdeno (Mo) se requiere para la catálisis de reacciones redox y forma parte de al menos 50 enzimas bacterianas.
- El cadmio (Cd) no tiene una función conocida en organismos superiores, pero se ha encontrado una anhidrasa carbónica dependiente de Cd en algunas diatomeas marinas.
- El estaño (Sn) es requerido para el crecimiento de algunas especies.
- El tungsteno (W) lo usan algunas arqueas y bacterias para procesos metabólicos.

Aunque determinados metales tales como el Zn, Cu, Mn, Ni o Co son considerados micronutrientes esenciales pueden resultar también nocivos para los organismos si se encuentran en exceso (Maret, 2016). Otros metales como el cadmio (Cd), el plomo (Pb), el mercurio (Hg) o la plata (Ag) no se encuentran fisiológicamente en los organismos, pero se ha evidenciado que si los organismos son expuestos a ellos durante largos períodos de tiempo resultan en elevada toxicidad (Jaishankar *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2011). Por ello, las células han desarrollado sistemas homeostáticos

complejos para garantizar las concentraciones de metales necesarias para la célula y hacer frente a las concentraciones nocivas de iones metálicos tóxicos (Bleackley *et al.*, 2011). Entre los mecanismos homeostáticos que regulan la presencia de metales pesados se encuentran los que actúan frente a la escasez de metales o los que lo hacen frente a un aumento de los mismos. Determinados factores de transcripción inducibles por un aumento de iones metálicos responden aumentando la expresión de genes que codifican para exportadores de metales o para metalotioneínas. Por otro lado, otros factores de transcripción son sensibles a la falta de metales en la célula y actúan induciendo la expresión de importadores de metales.

1.4.1. Hierro

El Fe es un cofactor esencial, requerido en concentraciones muy pequeñas, para una amplia gama de procesos celulares, pero su exceso es tóxico para las células (Halliwell *et al.*, 1984). Se trata de un componente esencial para cientos de proteínas y enzimas que realizan funciones biológicas esenciales, como el transporte de oxígeno, la producción de energía y la síntesis de ADN. Las globinas, los citocromos y las peroxidasas requieren hemo, que contiene hierro, como grupo prostético para sus actividades biológicas. El hierro existe en dos estados de oxidación biológicamente relevantes: la forma ferrosa (Fe^{2+}) y la forma férrica (Fe^{3+}).

Las globinas, como la hemoglobina o la mioglobina, son proteínas que contienen el grupo hemo y están involucradas en el transporte y almacenamiento de oxígeno y, en menor medida, pueden actuar como captadores de radicales libres (Berg *et al.*, 2002). Los citocromos son enzimas que participan en el transporte de electrones y, por lo tanto, en la producción energética celular en las mitocondrias (Berg *et al.*, 2002). La enzima catalasa y algunas peroxidasas son enzimas que protegen a las células contra la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), potencialmente dañinas (Berg *et al.*, 2002).

1.4.2. Zinc

El Zn es un elemento traza esencial tanto para la especie humana como para otros animales (Prakash *et al.*, 2015; Prasad, 2008), y plantas (Broadley *et al.*, 2007), así como para determinados microorganismos, como por ejemplo *Aspergillus niger* o *Escherichia coli* (Sugarman, 1983). Todos los organismos necesitan Zn, sin embargo, para un crecimiento óptimo las bacterias lo precisan menos que las algas y los hongos (Sugarman, 1983). En diferentes microorganismos, como por ejemplo *Clostridium perfringens* (Sato *et al.*, 1973), *Pseudomonas aeruginosa* (Jensen *et al.*, 1980),

Aeromonas hydrophila (Riddle *et al.*, 1981) o *C. albicans* (Soll *et al.*, 1981), el Zn se ha identificado como un factor de virulencia.

Después del hierro, el zinc es el metal de transición más abundante y esencial con funciones clave catalíticas, reguladoras, antioxidantes y estructurales (King, 2011). El Zn es cofactor de numerosas enzimas oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Coleman, 1998), resultando esencial en la división celular (Heyneman, 1996), la síntesis de ADN y proteínas (Trumbo *et al.*, 2001), la respiración celular y determinadas funciones inmunológicas. El Zinc como cofactor estructural más abundante se manifiesta en los dedos de Zn, frecuentes en factores de transcripción y en las interacciones proteína-proteína (Bird *et al.*, 2000; Bonaventura *et al.*, 2015). También se ha demostrado su función como mensajero secundario intracelular en varias vías de transducción de señales (Yamasaki *et al.*, 2007).

El Zn citosólico libre se encuentra a concentraciones muy bajas y es almacenado en el interior celular distribuyéndose en el citoplasma (50 %), en el núcleo (30 % - 40 %) y en la membrana plasmática (10 %) (Kambe *et al.*, 2015; Thiers *et al.*, 1957). Por tanto dentro de la célula el Zn puede funcionar como cofactor de metaloenzimas o puede ser almacenado unido a metalotioneínas (Plum *et al.*, 2010) o compartimentalizado en orgánulos intracelulares o vesículas (Hennigar *et al.*, 2012; Kambe, 2011; Maret, 2017). El zinc almacenado en las metalotioneínas representa del 5 % al 15 % de la reserva total de Zn de la célula (Coyle *et al.*, 2002; Kambe *et al.*, 2015; Kambe *et al.*, 2004). Las vesículas que almacenan zinc denominadas zincosomas, han sido detectadas en varios tipos celulares, incluyendo levaduras y parecen tener una función endocítica (Ballestin *et al.*, 2010). En resumen, en la regulación de la homeostasis celular de Zn están involucradas principalmente MTs, transportadores de Zn, ligandos de baja afinidad y metalochaperonas (Eide, 2006; Fukada *et al.*, 2011; Lichten *et al.*, 2009; Sinclair *et al.*, 2012).

1.4.3. Cobre

El cobre es un metal de transición esencial debido a que los iones de Cu pueden oxidarse o reducirse debido a su habilidad para donar o aceptar electrones conocida como potencial redox. Este potencial es esencial para los procesos bioquímicos celulares, tales como la respiración, la transmisión neuronal, la maduración de los tejidos, la defensa frente al estrés oxidativo y el metabolismo del hierro (Askwith *et al.*, 1994; Askwith *et al.*, 1996; Linder, 1991; Nevitt *et al.*, 2012). Sus concentraciones celulares se mantienen en unas cifras muy reducidas ya que su exceso puede resultar fácilmente tóxico (Blatzer *et al.*, 2017).

Este metal se encuentra principalmente en dos estados de oxidación: Cu(II) (oxidado) y Cu(I) (reducido), lo que producirá diferentes geometrías de coordinación. Cu²⁺ se coordina mejor con dadores de nitrógeno u oxígeno, como histidina o glutamato, respectivamente, mientras que a Cu⁺ le ocurre lo mismo con dadores sulfuro como cisteína o metionina.

El Cu actúa como cofactor en enzimas involucradas en la respiración celular (citocromo c oxidasa), en la detoxificación de radicales libres (superóxido dismutasa), en la pigmentación (tirosinasa), en la maduración del colágeno (lisil oxidasa) y en la captación de hierro (Ding *et al.*, 2014; Lutsenko, 2010; Nevitt *et al.*, 2012).

Es frecuente que el Cu, junto a otros ligandos como el oxígeno o el nitrógeno, se coordine con proteínas para inducir cambios conformacionales, interacciones proteicas o reacciones catalíticas (Kim *et al.*, 2008). Sin embargo, la acumulación de Cu por encima de la capacidad homeostática genera toxicidad. Un exceso de los iones de Cu libres en el citoplasma lleva a (Fridovich, 1983; Macomber *et al.*, 2009):

- La inactivación de determinadas metaloenzimas mediante el desplazamiento del metal que este unido.
- Desplazar al hierro en varios grupos Fe-S o a inactivar a enzimas que contengan dichos grupos.
- La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la química de Fenton.

1.4.4. Cadmio

El cadmio es un metal de transición divalente el cual no tiene un rol biológico conocido en los organismos superiores, sin embargo, resulta tóxico a nivel biológico y constituye un grave contaminante ambiental (Charlesworth *et al.*, 2011; Luevano *et al.*, 2014). Este metal se acumula en el ambiente a través de desechos de suelos acidificados, aguas residuales urbanas, fertilizantes fosfato agrícolas y como resultado de determinadas actividades industriales (Khan, 2005). El Cd es uno de los contaminantes ambientales más tóxicos y peligrosos ya que provoca estrés abiótico afectando al crecimiento de las plantas (Xu *et al.*, 2012). Su acción tóxica radica en interferir en el metabolismo celular como un sustituto nocivo del Zn (Deckert, 2005), reemplazándolo en varias proteínas, alterando los procesos biológicos y produciendo disfuncionalidad, mutagénesis y muerte celular (Tang *et al.*, 2014).

Los organismos cuentan con sistemas para eliminar el Cd de las células: i) inducción de estrés oxidativo, ii) activación de bombas celulares y iii) quelantes del Cd

como metalotioneínas, glutatión (GSH) o las fitoquelatinas (PCs) (Bertin *et al.*, 2006; Vido *et al.*, 2001).

Los microorganismos se han adaptado a la presencia de Cd ya que su rango de tolerancia al Cd oscila de 20 a 1000 mg kg⁻¹ (Babich *et al.*, 1977). Aunque en términos generales las algas, las cianobacterias, los animales y las plantas son más sensibles frente al Cd que las bacterias y los hongos (Clemens *et al.*, 2009). En *S. cerevisiae* el cadmio entra en la célula a través de las proteínas Zrt1p, Fet4, Sm1p o Mid1p y su eliminación se realiza a través de Pca1p, una ATPasa exportadora tipo P o transportadores de Cd que lo secuestran en las vacuolas, destacando Zrc1p, Bpt1p y Ycf1p (Wysocki *et al.*, 2010). La quelación de Cd la llevan a cabo principalmente las metalotioneínas y fitoquelatinas.

1.5. Metales y patogénesis fúngica

Durante los procesos infecciosos, los niveles de micronutrientes como el Cu o el Zn son manejados por el huésped con el objetivo de limitar el desarrollo microbiano. En este escenario, los microorganismos pueden sufrir limitación de ciertos metales o envenenamiento por toxicidad metálica. Mientras que la lucha por el hierro en la relación huésped-patógeno está bien documentada, existe un gran desconocimiento sobre la inmunidad nutricional del cobre y el zinc.

Diferentes proteínas involucradas en las homeostasis del Cu se han reconocido como factores de virulencia en *Saccharomyces cerevisiae*, en *Cryptococcus neoformans*, en *Candida albicans* (Balamurugan *et al.*, 2006; Ballou *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) y en *A. fumigatus* (Wiemann *et al.*, 2017), entre otros. El motivo principal por el cual el Cu indirectamente es un reconocido factor de virulencia es su participación como cofactor de muchas enzimas que contribuyen a la patogenicidad, como las lacasas o las superóxido dismutasas (SOD) (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2019).

Por otro lado, se ha demostrado que durante la infección, el Cu actúa como mecanismo de defensa del huésped contra patógenos en los fagolisosomas, juntamente con las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wiemann *et al.*, 2017) durante la explosión oxidativa. Se ha estudiado que en los procesos infecciosos por *A. fumigatus* los macrófagos del huésped responden acumulando Cu dentro del fagosoma mediante el aumento de la expresión de la proteína importadora de Cu Ctr1 y la bomba exportadora de Cu ATPasa ATP7A en la membrana del fagosoma (Wiemann *et al.*, 2017). En este caso ATP7A actúa igual que Ctr1 como importadora promoviendo la entrada del Cu al fagosoma para que a su vez entre a la célula fúngica.

Alteraciones en cualquiera de los factores de transcripción que controlan la homeostasis del Cu tienen un efecto directo en la virulencia. Estudios recientes han revelado que AfMacA es necesario para la patogenicidad de *A. fumigatus* (Cai *et al.*, 2017). También se ha demostrado el rol en virulencia del FT AfAceA. Como se ha mencionado anteriormente este FT es el que controla la expresión de la ATPasa AfcraA responsable de la detoxificación de Cu en *A. fumigatus*. La inactivación de AfAceA inhibe la expresión de AfcraA lo que produce que sean las células del sistema inmune del huésped las encargadas de movilizar el Cu. Por lo tanto, la maquinaria de detoxificación es un factor clave en la viabilidad del patógeno durante la infección (Wiemann *et al.*, 2017).

En el estudio de la maquinaria de detoxificación de *C. neoformans* se halló que las metalotioneínas son esenciales para la virulencia. Las cepas mutantes en las dos isoformas de metalotioneínas en *C. neoformans* mostraron una severa atenuación de la virulencia y una reducida colonización pulmonar en un modelo murino de infección pulmonar (Ding *et al.*, 2013). Además, este estudio reveló que durante la infección fúngica pulmonar aumenta la expresión génica de las MTs y de la importadora de Cu (Ctr1) y disminuye la expresión de ATP7A demostrando que el huésped moviliza Cu hacia el interior del fagosoma como una defensa antifúngica innata, pero *C. neoformans* detecta y neutraliza este Cu tóxico para promover la infección.

En el fitopatógeno *M. grisea* se ha identificado una metalotioneína (MMT1) la cual es necesaria para la virulencia del hongo (Tucker *et al.*, 2004). El mutante generado en MMT1 mostró unas tasas de crecimiento de las hifas aceleradas y esporulación deficiente por lo cual esta cepa fue incapaz de causar patología en la planta.

En la lucha entre el patógeno y el huésped durante los procesos infecciosos el Zn juega también un papel fundamental para la supervivencia y la virulencia fúngica (Walencik *et al.*, 2016). Se ha comprobado que durante procesos de invasión e infección el huésped restringe el Zn disponible creando un ambiente con pH neutro lo cual disminuye la solubilidad del Zn, el cual es soluble a pH ácido (Gerwien *et al.*, 2018). En respuesta el hongo produce moléculas de unión a Zn de alta afinidad. A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, *A. fumigatus* y *C. albicans* presentan transportadores de Zn regulados por pH. En ambientes de pH neutros a alcalinos, bajos en Zn, producidos por el huésped durante las infecciones fúngicas, *A. fumigatus* emplea el transportador de zinc ZnfC y *C. albicans* el transportador Znf1, los cuales no tienen un ortólogo en *S. cerevisiae* (Amich *et al.*, 2010). Los transportadores de *A. fumigatus* que funcionan en ambientes ácidos son ZnfB y ZnfA y en *C. albicans* es el

Zrt2. El transportador de Zn Zip1 de *C. neoformans* (homólogo al Zrt1 de *S. cerevisiae*) juega un papel relevante en la absorción de Zn y en la virulencia de *C. neoformans* (Do *et al.*, 2016).

Otro de los mecanismos por los que el huésped reduce la disponibilidad de Zn a los hongos patógenos depende de la actividad de la calprotectina, un heterodímero que une Zn y Mn con alta afinidad (Corbin *et al.*, 2008) y es el principal componente antifúngico de los NETs (trampas extracelulares de neutrófilos) del huésped (Branzk *et al.*, 2014). De hecho, los NETs y la calprotectina inhiben eficazmente el crecimiento de *C. albicans*, *A. fumigatus* y *C. neoformans* (McCormick *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2015; Urban *et al.*, 2009).

1.6. Homeostasis de metales pesados relevantes en hongos

1.6.1. Homeostasis del Zinc

La homeostasis del Zn está altamente conservada en los organismos, eucariotas y procariotas comparten muchas de las proteínas de unión a Zn. La regulación de los niveles de Zn y la maquinaria proteica involucrada en su homeostasis (transportadores, factores de transcripción y mecanismos que permiten el tráfico de Zn dentro de la célula) han sido estudiados y descritos en organismos modelo como *S. cerevisiae* o *A. fumigatus*. Como se describe en la figura 5, altas concentraciones de Zn en el hongo inhiben factores de transcripción encargados de importar este ion metálico al interior de las células.

En levaduras el principal factor de transcripción (FT) que regula la homeostasis del Zn es Zap1 (responsive activator protein 1) también conservado entre hongos (Garcia Silva-Bailao *et al.*, 2018). Mientras que en *Aspergillus fumigatus* el principal regulador del Zn es el factor de transcripción ZafA, que regula la expresión de los transportadores ZIP, ZrfA, ZrfB y ZrfC (Moreno *et al.*, 2007). Estos factores de transcripción interaccionan con las secuencias consenso MRE (elementos de respuesta a metales) localizados en los promotores de los genes diana (Stuart *et al.*, 1985). Por tanto la respuesta inducible a metales es conferida por múltiples secuencias MRE, como por ejemplo secuencias CuRE (inducibles por cobre) o secuencias ZRE (inducibles por zinc) (Gerwien *et al.*, 2018).

En el caso de limitación de Zn causada por el huésped, los hongos disponen de importadores de Zn de alta afinidad anclados a membrana y proteínas secretadas captadoras de Zn (Citiulo *et al.*, 2012). En *Saccharomyces cerevisiae* son los

transportadores de alta afinidad Zrt1 y de baja afinidad Zrt2 los responsables de la importación de zinc dentro la célula (Waters *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 1996a, 1996b).

Existen dos sistemas adicionales de baja afinidad para el Zn que participan en su transporte: Fet4 y Pho84. El transportador de Fe (Fet4) es un sistema de transporte de baja afinidad y de amplio espectro para Cu y Zn, el cual se ha identificado en *S. cerevisiae* (Dix *et al.*, 1994) y en *C. glabrata* (Gerwien *et al.*, 2016; Srivastava *et al.*, 2014) con posibles ortólogos en *C. neoformans* (Jacobson *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2009) y en *S. pombe* (Dainty *et al.*, 2008). Este transportador Fet4 actúa en condiciones de depleción de Zn, importando este metal junto a Fe y Cu dentro de la célula, en *S. cerevisiae* (Li *et al.*, 1998). Por otro lado, el transportador Pho84 puede importar Zn unido a fosfato (Jensen *et al.*, 2003).

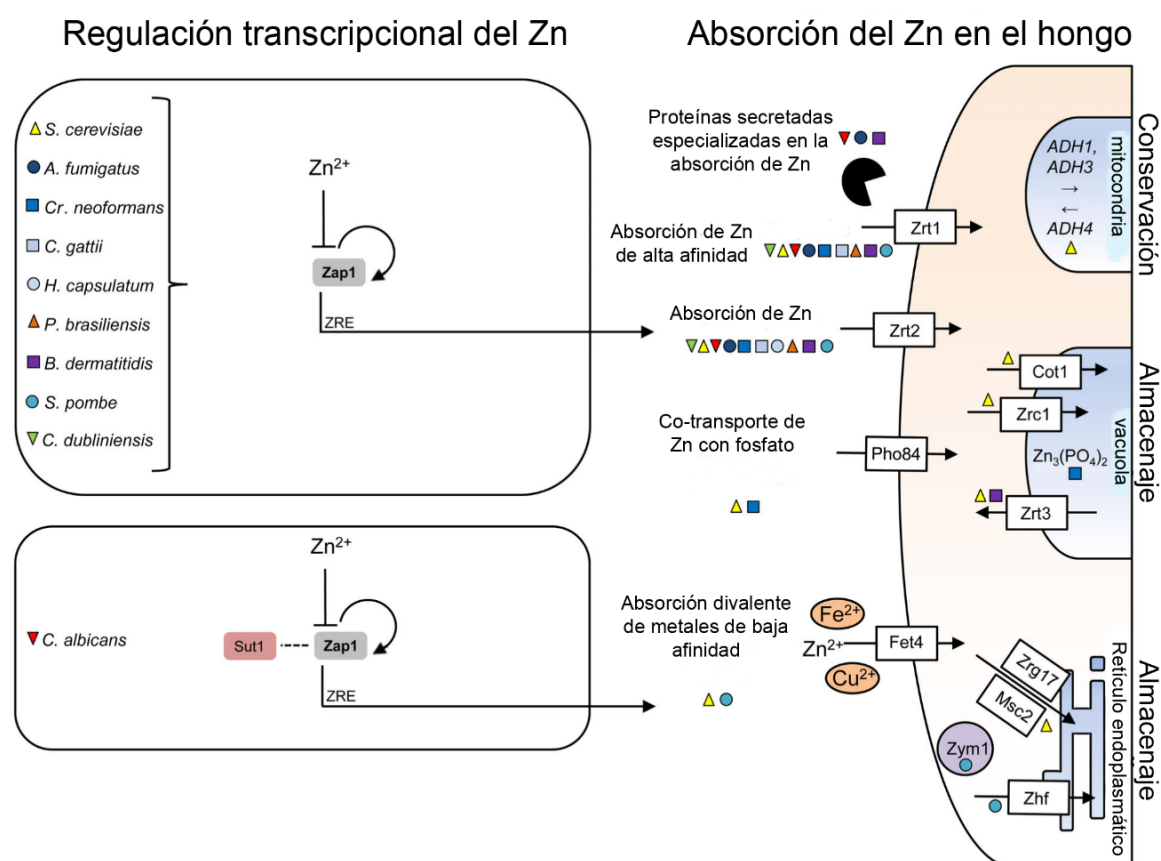


Figura 5. Homeostasis del Zinc en hongos. Adaptado de (Gerwien *et al.*, 2018).

1.6.2. Homeostasis del Cobre

Recientemente se han recopilado estudios sobre proteínas relevantes de unión a cobre en *A. fumigatus* y sus ortólogas en *S. cerevisiae*, en *C. albicans* y en *C. neoformans* (Wiemann *et al.*, 2017), que son principalmente i) factores de transcripción

inducibles por metales, ii) transportadores de metales, iii) metalotioneínas y iv) superóxido dismutasas.

Los factores de transcripción (FT) de unión a Cu regulan la expresión de genes requeridos para la supervivencia del hongo en ambientes de insuficiencia o toxicidad por dicho metal. Los FT que son activados en respuesta al Cu cumplen su función regulando la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el secuestro de Cu y/o en la protección frente a la toxicidad por cobre.

Hasta 6 factores de transcripción sensibles al Cu han sido identificados en hongos (Rutherford *et al.*, 2004); habiendo sido descritos tres de ellos en *A. fumigatus* (por ortología con *S. cerevisiae*): AceA, MacA y CufA, los cuales se caracterizan por presentar dominios conservados de unión al ADN y regiones ricas en cisteínas (Cai *et al.*, 2017; Kusuya *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2017; Upadhyay *et al.*, 2013; Wiemann *et al.*, 2017). Los mecanismos de actuación de dichos FT se podrían resumir de la siguiente manera:

- AceA o Ace1 en *S. cerevisiae* se activan en condiciones de toxicidad celular por Cu.
- MacA, Mac1 en *S. cerevisiae* o CaCTR1 en *C. albicans* (Marvin *et al.*, 2004) actúa en condiciones de falta de Cu.
- CufA (Haa1p en *S. cerevisiae*) es un factor de transcripción con función desconocida (Raffa *et al.*, 2019; Wiemann *et al.*, 2017).

Mac1 (Jungmann *et al.*, 1993) induce la expresión génica de sistemas de captación de Cu de alta afinidad; además de regular la expresión de metalo-reductasas (Georgatsou *et al.*, 1997; Labbe *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1998; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1997) a través de su unión a los CuRE (elementos de respuesta al Cu) (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1997). Cuando hay un exceso celular de Cu, Mac1 se degrada rápidamente para evitar la presencia tóxica de Cu (Zhu *et al.*, 1998).

El ortólogo de Mac1 en *C. neoformans* Cuf1 (Lin *et al.*, 2006; Waterman *et al.*, 2007) induce la absorción de Cu en condiciones de escasez del metal y además activa la expresión de las MTs cuando existe un exceso de Cu (Ding *et al.*, 2011) y ha sido el único FT encontrado en este hongo dedicado a la homeostasis del Cu.

Ace1 induce la expresión de dos MTs, CUP1 y CRS5, y de una superóxido dismutasa de Cu y Zn, SOD1 (Butt *et al.*, 1984; Culotta *et al.*, 1994; Fogel *et al.*, 1982; Gralla *et al.*, 1991; Karin *et al.*, 1984; Thiele, 1988; Welch *et al.*, 1989; Winge *et al.*, 1985).

La célula fúngica obtiene la fuente necesaria de Cu tanto del espacio extracelular como del almacenado en las vacuolas. Como podemos observar en la figura 6, el cobre generalmente se reduce de Cu^{2+} a Cu^+ mediante las mismas metaloreductasas de la membrana plasmática que actúan para el Fe. La reducción tiene lugar para que la absorción sea eficiente. Luego el Cu^+ es importado a través de importadores de alta afinidad altamente conservados, conocidos como Ctr (García-Santamarina *et al.*, 2015); habiéndose descrito cuatro de ellos en *A. fumigatus*, CtrA1, CtrA2, CtrB/ Ctr2 y CtrC (Cai *et al.*, 2017), el Ctr1 de *C. albicans* (Marvin *et al.*, 2003), Ctr1 y Ctr4 en *C. neoformans* (Ding *et al.*, 2011). En *S. cerevisiae* el transportador de hierro Fet4 también importa cobre con baja afinidad (Hassett *et al.*, 2000).

Una vez dentro de la célula fúngica, el Cu^+ potencialmente tóxico es inmediatamente unido a diferentes chaperonas específicas, que permiten su transporte rápido dirigido a enzimas que requieren Cu. Las MTs también están presentes en este escenario para prevenir a la célula de la toxicidad generada mediante altas concentraciones de Cu. Recientemente se ha identificado una alta resistencia al Cu mediada por una ATPasa tipo P (Crp1) que realiza un transporte activo de Cu hacia fuera de la membrana plasmática en *C. albicans* (Riggle *et al.*, 2000; Weissman *et al.*, 2000).

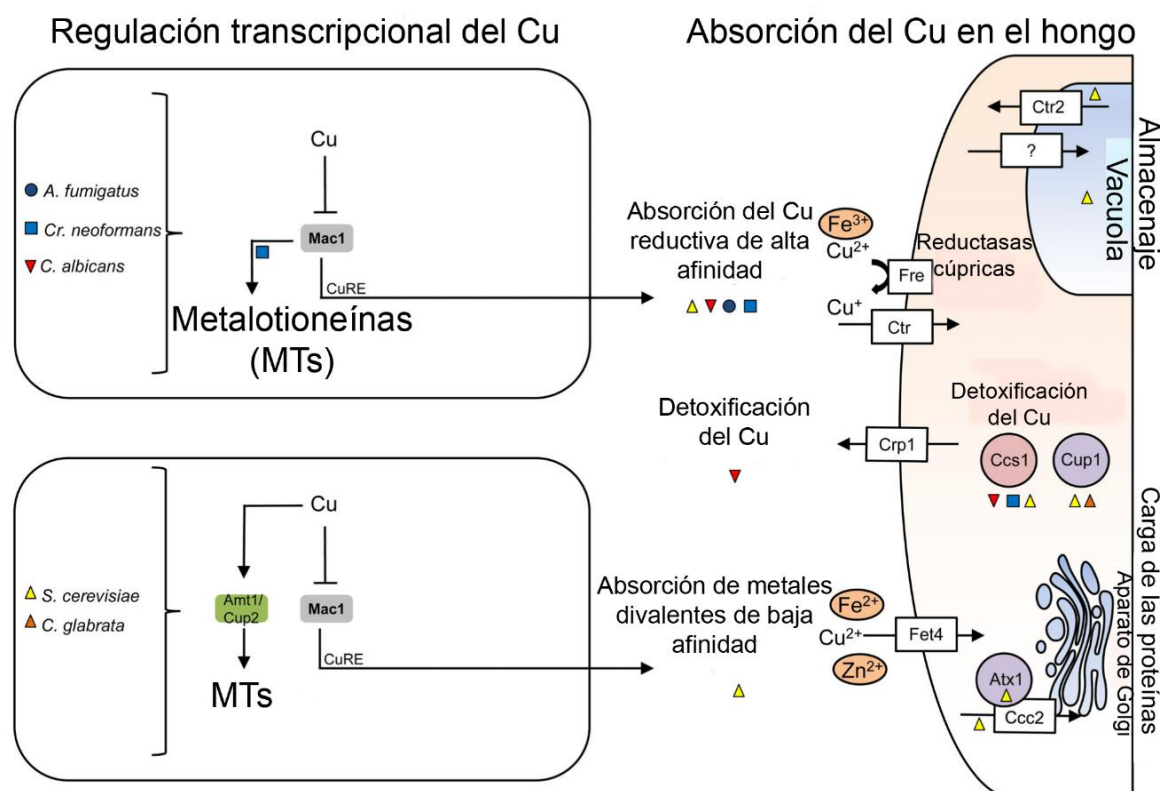


Figura 6. Homeostasis del Cobre en hongos. Adaptado de (Gerwien *et al.*, 2018).

1.7. Proteínas de detoxificación de metales

1.7.1. Exportadoras de Cu ATPasas tipo P_{IB}

Se trata de proteínas reguladoras de los niveles intracelulares de Cu que translocan este ion metálico en diferentes membranas del sistema endomembranoso y están altamente conservadas en todos los reinos (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2017; Palmgren *et al.*, 2011). Estas exportadoras entregan Cu a enzimas en el compartimento del trans-Golgi o permiten el tráfico de Cu desde el trans-Golgi hasta la membrana plasmática para que salga fuera de la célula, dependiendo de las necesidades celulares de este metal. Se han descrito como el principal determinante de resistencia a cobre en bacterias (Ladomersky *et al.*, 2015) y en eucariotas están involucradas en la unión de Cu a enzimas sintetizadas de *novο* en la vía secretora. Por lo general, presentan:

- de 6 a 8 dominios transmembrana (TMDs)
- dominios de unión a metales (MBD, metal binding domains), ricos en cisteínas (Cys) e histidinas (His) situados en el dominio citoplasmático N-terminal caracterizados por presentar la secuencia consenso CxxC
- dominios asociados a los metales pesados (HMA, heavy metal associate domains) caracterizados por presentar la secuencia consenso GMxCxxC)
- un dominio fosfatasa
- un dominio de translocación de Cu (CPC) en el TMD₆
- un dominio aspartil quinasa
- un dominio de unión a ATP

En humanos, mutaciones en las ATPasas de Cu, hATP7A y hATP7B dan lugar a las enfermedades de Menkes y de Wilson, respectivamente. La proteína homóloga putativa de ATP7A en *C. albicans* es Crp1p y en *S. cerevisiae* es Ccc2p (Lowe *et al.*, 2004). Crp1p es una proteína crucial involucrada en la detoxificación de Cu junto a la metalotioneína Cup1p, la cual es responsable de la resistencia residual al Cu en mutantes de *CRP1* y ambas proteínas son esenciales para la patogenicidad (Douglas *et al.*, 2012; Mackie *et al.*, 2016; Schwartz *et al.*, 2013; Weissman *et al.*, 2000). Tanto CRP1 como CUP1 son inducidos transcripcionalmente por elevadas concentraciones de Cu a través del FT Acep1p (Schwartz *et al.*, 2013; Weissman *et al.*, 2000). En *C. albicans*, las funciones que involucran la distribución del Cu están repartidas entre 2 ATPasas tipo P_{IB}: CaCcc2 se ocupa de la compartimentalización del Cu en la red del

trans Golgi (TGN) y CaCrp1p es responsable de la detoxificación del Cu en la membrana plasmática (Riggle *et al.*, 2000; Weissman *et al.*, 2000). *C. albicans* está presente en diferentes ambientes, que van desde el tracto digestivo de algunos animales a suelos, donde la exportación mediada de Cu por CaCrp1p confiere una tolerancia superior que las MTs, a pesar del mayor costo de energía requerido para producirlo y operarlo (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2019).

La detoxificación del Cu en *A. fumigatus* está a cargo de la ATPasa tipo P_{IB}, AfCrpA (Wiemann *et al.*, 2017). Recientemente se ha descrito que *A. flavus* posee dos homólogas para la proteína CaCrp1p involucradas en la detoxificación del Cu (Yang *et al.*, 2018). La expresión de AfCrpA es altamente inducible en respuesta a la exposición de Cu. Además esta proteína se ha localizado cerca de la membrana plasmática y se ha visto involucrada en procesos de tráfico de Cu de la vía secretora (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2017). El factor de transcripción AceA participa en la detoxificación del Cu ya que activa transcripcionalmente la expresión de CrpA (Cai *et al.*, 2018). Recientemente, se ha demostrado que el transportador CrpA de *A. fumigatus* no solo está involucrado en la detoxificación del Cu, sino que también del Zn (Cai *et al.*, 2018). En *A. fumigatus*, la homeostasis del Zn y del Cu se puede simplificar en 3 proteínas: CrpA involucrada tanto en la detoxificación del Cu como del Zn, la metalotioneína AfCrda que tiene una función predominante en la detoxificación del Cu y el transportador AfZrcA cuya principal función es la detoxificación del Zn.

En *A. nidulans*, el ortólogo del gen *CaCRP1* de *C. albicans* que codifica para la ATPasa tipo P_{IB} es *crpA* y esta proteína es la encargada de la detoxificación del Cu en este hongo (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2017). AnCrpA mostró cierta promiscuidad en cuanto a su respuesta a la presencia de metales pesados. El patrón de expresión de *crpA* de *A. nidulans* mostró una elevación fuerte inicial de los niveles de ARNm y una expresión génica baja continuada en respuesta a niveles tóxicos de Cu durante largos períodos de tiempo. Igual que en *A. fumigatus* el FT AceA es necesario para inducir la expresión en respuesta a metales de CrpA en *A. nidulans*.

La delección de *crpA* resultó en una susceptibilidad aguda al Cu, tanto en *A. nidulans* como en *A. fumigatus* (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2017; Wiemann *et al.*, 2017). El mutante $\Delta crpA$ de *A. nidulans* también mostró susceptibilidad hacia otros metales, pero no fue comparable con la mostrada hacia el Cu, la cual fue la más severa. El mutante $\Delta crpA$ de *A. nidulans* mostró una resistencia reducida al Cu comparado con la cepa silvestre en un medio sólido. El mutante $\Delta crpA$ en presencia de 100 μ M de CuSO₄, mostró defectos morfológicos en el crecimiento de la colonia y a 150 μ M de CuSO₄ casi una

completa inhibición del crecimiento. A 100 μM de CuSO_4 la colonia del mutante exhibió el patrón de crecimiento radial típico de la cepa silvestre, pero con una densidad celular muy baja. Esta morfología celular fue nombrada "el fenotipo de cobre". ΔcrpA mostró cierta sensibilidad al Cd y a la Ag, pero muy inferior a la mostrada hacia el Cu (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2017).

AnCrpA se localiza en la membrana plasmática bajo estrés producido por Cu; sin embargo, dependiendo del nivel de estrés, la localización y la función de AnCrpA pueden cambiar. Después de media hora de adición de Cu para inducir la expresión de AnCrpA, los estudios de localización subcelular muestran que la fluorescencia se localizó en una red reticulada (muy probablemente el RE), en estructuras semejantes al núcleo y en la membrana plasmática. Una hora después de la adición de cobre, AnCrpA apareció homogéneamente disperso en el citoplasma y principalmente distribuido en la periferia celular, muy probablemente en la membrana plasmática.

1.7.2. Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MTs) son una superfamilia de metaloproteínas ricas en cisteínas. La primera identificación de una hipotética MT fue en el 1957 en el riñón de caballo (Margoshes *et al.*, 1957). Los primeros que denominaron a estas proteínas MTs fueron Kägi y Vallee, debido a su alto contenido en metales pesados y en residuos de Cys (Kagi *et al.*, 1960). Éstas proteínas están presentes en organismos eucariotas y en un gran número de procariotas. Inicialmente se asociaban con una secuencia corta de aminoácidos, sin embargo, metalotioneínas mas grandes han sido descritas (Ding *et al.*, 2013; Iturbe-Espinoza *et al.*, 2016). Son moléculas ubicuas, ricas en residuos de cisteína (15-30 % de los aminoácidos), termoestables y presentan un alto contenido metálico (Kagi *et al.*, 1984; Thirumoorthy *et al.*, 2007). De forma nativa pueden unir Zn(II) y/o Cu(I) , además presentan alta afinidad por otros metales iónicos no esenciales, como el Cd(II) . Tienen la capacidad de intercambiar metales debido a su elevada afinidad por los grupos tiolato de los diferentes metales (Capdevila *et al.*, 2011). Además, las MT pueden serceptoras o dadoras de iones metálicos entre proteínas o biomoléculas. Y es destacable la capacidad redox de sus grupos tiolato, susceptibles de oxidarse.

La estructura tridimensional de estas proteínas está determinada por su unión a metales iónicos. En su forma apo, sin metales unidos, no presentan una estructura secundaria definida. Se caracterizan por una alta estabilidad térmica y labilidad cinética. Sus motivos característicos son -XCXCX-, -XCCX-, XCCCX-.

Generalmente las MTs se expresan a niveles basales, pero su expresión puede aumentar en presencia de metales. Esta activación transcripcional puede ser debida a la actuación de factores de transcripción o a la unión directa de los iones metálicos (Andrews, 2000; Bourdineaud *et al.*, 2006; Haq *et al.*, 2003).

En un ambiente celular de toxicidad por metales se induce estrés oxidativo que a su vez desencadena la expresión de las MTs (Kumar *et al.*, 2005). En la región promotora de los genes de las *mts* se encuentran múltiples secuencias consenso, como los ya mencionados MRE (Giedroc *et al.*, 2001) que son los elementos de respuesta a metales, junto con elementos de respuesta antioxidante (ARE) que se activan ante la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sabolic *et al.*, 2010). Las ROS pueden ser producidas por niveles tóxicos de metales o por agentes oxidantes. De ahí el rol de rastreadoras de radicales libres (“free radical scavenging activity”) asociado a las MTs (Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013).

Entre los inductores de la expresión génica de las MTs orgánicos conocidos se encuentran los glucocorticoides, las citoquinas, los factores de crecimiento, la irradiación, los lipopolisacáridos bacterianos o la metilación del ADN (Collingwood *et al.*, 1999; Di Croce *et al.*, 1999; Haq *et al.*, 2003; Sabolic *et al.*, 2010).

Las MTs pueden adoptar tres formas diferentes: apoproteína (sin metal unido), oxidada o unidas a metales, en grados variables. La interacción de las MTs en estas tres formas mencionadas con múltiples moléculas sugieren un rol multifuncional celular para estas proteínas (Ziller *et al.*, 2018). No existe una única función para las MTs y esta multifuncionalidad se debe principalmente a la diversidad de secuencias de las MTs y a su habilidad de coordinar diferentes metales iónicos (Blindauer *et al.*, 2010; Coyle *et al.*, 2002; Palmiter, 1998). Participan en la detoxificación de metales pesados y así evitan el daño celular y mantienen un ambiente fisiológico favorable mediante el secuestro de iones metales tóxicos (Hamer, 1986). También están involucradas en la homeostasis de iones metálicos manteniendo las concentraciones de metales fisiológicos en el rango adecuado, ya que metales fisiológicos, como el Cu(I) o el Zn(II) pueden ser nocivos a altas concentraciones (Beltramini *et al.*, 1982). Actúan además como agentes antioxidantes eliminando radicales libres mediante la oxidación de sus grupos tiolato y liberando iones metálicos (Viarengo *et al.*, 2000). Las MTs podrían participar asimismo en el plegamiento de otras proteínas, tales como factores de transcripción u otras metaloproteínas (Winge *et al.*, 1998). Otras funciones menos conocidas han sido atribuidas también a las MTs entre las que se encuentran su participación en el control metabólico (Beattie *et al.*, 1998), un posible rol antiapoptótico

(Kondo *et al.*, 1997) o ayudar en la protección y regeneración celular (Pedersen *et al.*, 2009).

Tanto la secuencia de aminoácidos como la estructura tridimensional de estas proteínas son caracteres determinantes de su habilidad para unir metales y de sus funciones. Han sido propuestas diferentes clasificaciones de las MTs:

1. Según el patrón de Cys y su distribución en la secuencia polipeptídica (Blindauer, 2014; Kagi *et al.*, 1987).
2. De acuerdo a las relaciones filogenéticas en conjunto con las similitudes de secuencia (Binz *et al.*, 1999; Blindauer, 2014).
3. Basada en las preferencias de unión a metales. Esta clasificación es la más actual y es de carácter funcional. Primeramente, se clasificaron las MTs en 2 categorías, las Zn-tioneínas y las Cu-tioneínas pero se tuvieron que reclasificar debido a que estas preferencias metálicas se presentaban parciales o compartidas entre varios metales, no genuinas (Bofill *et al.*, 2009; Valls *et al.*, 2001).

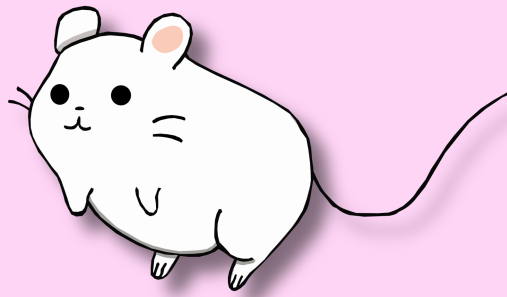
Algunas de las MTs fúngicas caracterizadas hasta el momento son (tabla 1):

Tabla 1. Metalotioneínas fúngicas caracterizadas.

Organismo	Metalotioneína	Referencia
<i>S. cerevisiae</i>	CRS5 y CUP1	Pagani <i>et al.</i> , 2007; Winge <i>et al.</i> , 1985
<i>Candida glabrata</i>	MT-I y MT-II	(Mehra <i>et al.</i> , 1989)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Zym1	(Borrelly <i>et al.</i> , 2002)
<i>Amanita strobiliformis</i>	AsMT1, AsMT2 y AsMT3	Hlozkova <i>et al.</i> , 2016
<i>Neurospora crassa</i>	CuMT	Kumar <i>et al.</i> , 2005
<i>Heliscus lugdunensis</i>	Neclu_MT1	Loebus <i>et al.</i> , 2013
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cmt1 y Cmt2	Ding <i>et al.</i> , 2013
<i>Magnaporthe grisea</i>	MMT1	Tucker <i>et al.</i> , 2004
<i>Lentinula edodes</i>	Cadmium-Binding MT	Dong <i>et al.</i> , 2019
<i>Podospora anserina</i>	PaMt1	Averbeck <i>et al.</i> , 2001
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	HmMT1, HmMT2 y HmMT3	Sacky <i>et al.</i> , 2014
<i>Suillus luteus</i>	SIMTa y SIMTb	Nguyen <i>et al.</i> , 2017
<i>Pisolithus albus</i>	PaMT1	Reddy <i>et al.</i> , 2015
<i>Laccaria bicolor</i>	LbMT1 y LbMT2	Reddy <i>et al.</i> , 2014
<i>Tremella mesenterica</i>	TmMT	Iturbe-Espinoza <i>et al.</i> , 2016

En las últimas dos décadas el interés en MTs fúngicas ha aumentado y con ello han sido descubiertas MTs con características nuevas a las descritas inicialmente. Así por ejemplo, *Yarrowia lipolytica* presenta una MT con un motivo inusual de Cys, -CCC-, no identificado en otras MT fúngicas (García *et al.*, 2002). Sorprendentemente, la MT de *Heliscus lugdunensis* presenta una clara preferencia de unión a Cd, mayor que al Cu (Loebus *et al.*, 2013). En el caso de *C. neoformans* ha sido llamativo el hallazgo de MTs con secuencias largas, no observadas en ninguna MT previamente descrita (Ding *et al.*, 2011).

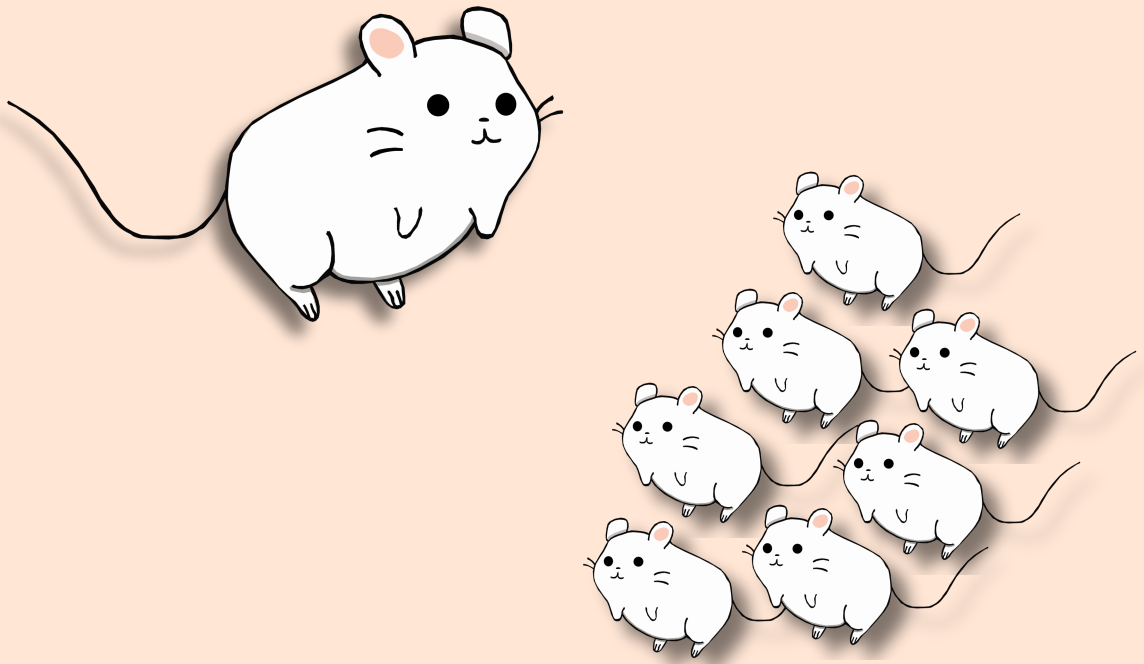
2. HIPÓTESIS



Algunos metales pesados tienen un papel fundamental en la fisiología celular de todos los organismos, siendo cofactores esenciales para la actividad de numerosas enzimas, y por lo tanto necesarios para el desarrollo de la vida. Alteraciones en las concentraciones intracelulares óptimas de estos iones esenciales resultan en un mal funcionamiento de procesos bioquímicos celulares, y tanto el exceso como la carencia de estos elementos resulta dañino para las células. El estudio de la regulación homeostática de metales en hongos patógenos resulta de interés, existiendo numerosos estudios que apuntan a que los metales juegan un papel sorprendentemente central en los procesos de infección fúngica, (Ding *et al.*, 2013; Gerwien *et al.*, 2017; Tucker *et al.*, 2004). Por ello planteamos como primera hipótesis que determinadas proteínas involucradas en la homeostasis celular de metales pesados en otros organismos, como metalotioneínas y exportadoras de metales podrían estar involucradas en la patogenicidad de *F. oxysporum*. Ello estaría fundamentado en el hecho de que las metalotioneínas (Mts) capturan iones metálicos, y algunas proteínas transportadoras exportan iones, protegiendo a la célula de la toxicidad por metales. Por lo tanto, en un escenario de infección fúngica el huésped respondería generando un ambiente de toxicidad por metales y los hongos usarían MTs y exportadoras como mecanismos de defensa (Garcia-Santamarina *et al.*, 2015; Wiemann *et al.*, 2017). La elección de dicha especie fúngica como objeto de estudio, se realizó debido a que *F. oxysporum* es un importante patógeno de plantas y un hongo causante de infecciones oportunistas en el ser humano, por lo que el uso de dicha especie nos permitiría ensayar que impacto tienen los mecanismos homeostáticos de metales pesados en diferentes hospedadores i.e., plantas (tomate) y mamíferos (ratón).

Según esta hipótesis la delección de genes codificantes de metalotioneínas y transportadores de metales en *F. oxysporum* promovería la acumulación de iones tóxicos en la célula y reduciría la virulencia del hongo en los procesos infecciosos. Para probar esta hipótesis y demostrar que estos genes seleccionados participan en la homeostasis de metales pesados, se procedió a realizar estudios transcripcionales, mutagénesis dirigida, análisis de afinidad de metales y localización subcelular que han contribuido al desarrollo de la presente tesis doctoral.

3. OBJETIVOS



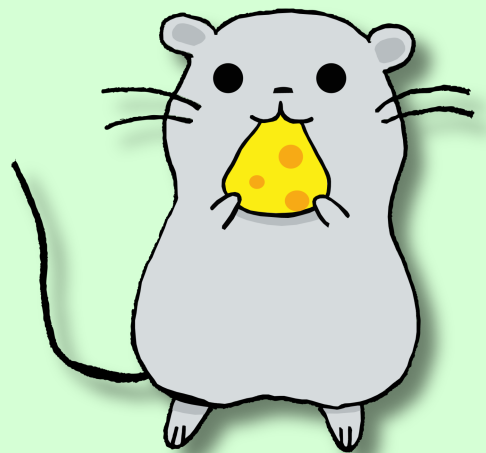
Objetivos generales

Estudiar el papel de la metalotioneína Mt1 (FOXG_02862) y de la proteína exportadora de cobre CrpF (FOXG_03265) en la homeostasis celular de metales pesados y en la virulencia del hongo *Fusarium oxysporum*.

Objetivos específicos

1. Detectar in silico los genes *mt1* (FOXG_02862) y *crpF* (FOXG_03265) en el genoma de *F. oxysporum*.
2. Generar cepas de *F. oxysporum* mutantes defectivas (KO) en *mt1* ($\Delta mt1$) y *crpF* ($\Delta crpF$).
3. Caracterizar fenotípicamente a los mutantes $\Delta mt1$ y $\Delta crpF$ frente a diferentes metales pesados y evaluar la acumulación de cobre en el mutante $\Delta crpF$.
4. Evaluar la expresión de genes relacionados con la homeostasis de metales pesados y con estrés oxidativo en las cepas mutantes ($\Delta mt1$ y $\Delta crpF$) y en la silvestre (wt), en ausencia o presencia de metales pesados (Cadmio, Cobre y Zinc).
5. Evaluar la virulencia de las cepas $\Delta mt1$ y $\Delta crpF$ en líneas celulares de macrófagos, en modelos murinos de infección sistémica y en tomatera.
6. Estudiar las preferencias de unión de la hipotética Mt1 localizada en *F. oxysporum* frente a los metales pesados Cadmio, Cobre y Zinc, mediante Espectrometría de Masas con Ionización por Electro spray (ESI-MS) y Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).
7. Localizar subcelularmente a la proteína Mt1 en la cepa 4287 de *Fusarium oxysporum* mediante técnicas de inmunodetección.

4. MATERIALES Y MÉTODOS



4.1. Materiales

4.1.1. Organismos usados

Las estirpes bacterianas, fúngicas y líneas celulares, y los cultivares de plantas utilizados en este trabajo se describen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Material biológico empleado

Especie	Estirpe/cultivar	Descripción /uso
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	La cepa DH5 α de <i>E. coli</i> se utilizó como receptora de experimentos de transformación genética con el vector pGEM®-T (Promega)
	BL21	La cepa BL21 (DE3) de <i>E. coli</i> se utilizó como receptora de experimentos de transformación genética con el vector expresión pET-SUMO (Invitrogen)
<i>Fusarium oxysporum</i>	4287	Estirpe silvestre
	$\Delta mt1$	Gen <i>mt1</i> deletado
	$\Delta mt1^c$	Mutante $\Delta mt1$ complementado con una copia de <i>mt1</i>
	$\Delta crpF$	Gen <i>crpF</i> deletado
	$\Delta crpF^c$	Mutante $\Delta crpF$ complementado con una copia de <i>crpF</i>
Macrófagos murinos	(BALB/c) J774.1	Se usaron para evaluar la virulencia de las cepas mutantes de <i>F. oxysporum</i>
Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	Monika	Cultivar sensible a raza 2 de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>

4.1.2. Medios de cultivo

Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Medio Luria-Bertani

Líquido (LB): bacto triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (5 g/L).

Sólido (LA): medio líquido LB suplementado con 15 g/L de bactoagar.

Medio LA-X-Gal-Ampicilina-IPTG

Medio LA suplementado con 134 μ M de isopropil-1-tio- β -Dgalactopiranosido (IPTG), 0,005 % (p/v) X-Gal (disuelto en formamida) y 0,005 % ampicilina (p/v).

Medios de cultivo para *Fusarium oxysporum*

Medio nutritivo

Líquido (PDB): hervir 200g de patatas peladas y troceadas en 1 L de agua durante 60 min. Filtrar, añadir 20g de glucosa, enrasar hasta 1 L y esterilizar en el autoclave.

Sólido (PDA): 3,9 % agar de patata y dextrosa (p/v) (Pronadisa, España).

Medio sintético de ARNE (SM)

Líquido: MgSO₄ 7 H₂O (0,2 g/L), KH₂PO₄ (0,4 g/L), KCl (0,2 g/L), NH₄NO₂ (1 g/l), FeSO₄ (0,01 g/L), ZnSO₄ (0,01 g/L), MnSO₄ (0,01 g/L) y glucosa (10 g/L).

Sólido: medio líquido suplementado con 15 g/L de bacto-agar.

Medio mínimo de regeneración

Líquido: MgSO₄ 7 H₂O (0,5 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), KCl (0,5 g/L), NaNO₃ (2 g/L), glucosa (20 g/L) y sacarosa (200 g/L).

Sólido: medio líquido suplementado con 12,5 g/L agar (Oxoid) para medio sólido ó 4 g/L para agar de cobertura.

4.1.3. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación y secuenciación se diseñaron con el programa Oligo optimizando su estabilidad interna y excluyendo la formación de horquillas y dímeros no deseados, así como diversos parámetros físicos y químicos (T_m, T_d, % G+C, % A+T). Los oligonucleótidos se sintetizaron en las empresas comerciales: Macrogen Corp. Europa (Ámsterdam, Holanda) o Integrated DNA Technologies (EE.UU.).

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos de *F. oxysporum*. En letras mayúsculas se indican las secuencias específicas del ADN molde y en minúsculas cursivas se muestran las secuencias añadidas.

Nombre	Gen	Secuencia (5' → 3')	Uso
crpF-F1	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	GGTAGTTTTGCTTCTGCTGTT	Mutante nulo
crpF-F2n	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	TGGTCCCGTTTCTCAAGGTG	
crpF-M13F-R1	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	<i>gtcgtgactgggaaaaccctggcg</i> GCGTTGTGTGTTGTGATGAAA	
crpF-M13R-F3	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	<i>tcctgtgtgaaattgtatccgc</i> TTAGGAATGGCGGTAGTGGT	
crpF-R2	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	AGTGAATGTGTAAGCCAGTGT	
crpF-R3n	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	ACCGCAAACAGTCAAATCCTTC	qPCR
crpF-F4	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	TGATTGCTCCCTCTTACACG	
crpF-R4	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	GCTACTCTCCCCGTCAACCT	
crpF-F5	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	CCGTTGCTCTGCCGTATCTT	
crpF-R5	<i>crpF</i> (FOXG_03265)	TCCTCTCCTCTCCTCTCCAC	
g3pdh-F1	<i>gapdh</i>	ACCACCGTCCACTCCTACAC	
g3pdh-R2	<i>gapdh</i>	GATCTGGTCGTAAGAAGCACC	
act-9	<i>actina</i>	GCGGTTACACTTTCTCCACCA	
act-10	<i>actina</i>	TTGAAGGTGGTGACATGGATAC	
peroxi-F1	<i>prx</i>	GCCTTCACCATCCGATCCGT	
peroxi-R2	<i>prx</i>	GGCTTGACGATGCGGAACCTC	
aceF-F4	<i>aceF</i> (FOXG_03428)	CGCCCACTTCAGCATATCAAC	

Nombre	Gen	Secuencia (5' → 3')	Uso
aceF-R6	<i>aceF</i> (FOXG_03428)	TCAGGAACGGTGTCAAGAGCA	Mutante nulo
aceF-F5	<i>aceF</i> (FOXG_03428)	CGGTCCCAGTCACAACACC	
mt1-1	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	TGAAATGTGAAGAGACGGG	
mt1-2 M13F	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	<i>gtcgtgactgggaaaaccctggcg</i> ACTACCTATGACTGAACTTG	
mt1-3 M13R	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	<i>tcctgtgtgaaattgttatccgct</i> CATTTCCAACATCAGACGAC	
mt1-4	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	AGGTTATCGTTGAGTCGGG	
mt1-5	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	CCCAATGACCACAATCGTAG	
mt1-9n	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	ACAAAGACGGCAAACGCAG	
mt1-10n	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	ATGAACCTCGCCAAAGAC	
mt1-11n	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	AACCCTCGCCAAAGACGTAGA	
mt1-6	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	GCCTCCGAAAACACCGTCA	qPCR
mt1-7	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	AAAGCCACCATCAGCAGCC	
mt1-8	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	CACAGAAACACAAACGCCAC	
mt1-12	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	TGCTCATGCGGTCAAAAGTCC	
mt1-13	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	CCATCAGCAGCCTTCTCGCA	
mt1-14	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	ATGGTCGTCAACACTCCCG	Clonación Mt1
mt1-15	<i>mt1</i> (FOXG_02862)	TTATTTCTTGGTAGTAAAGTCG	Clonación Mt1

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos del vector de clonación pGem®T.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
hyg-G	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA
hyg-Y	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA
M13F2	GCATTCTGGGTAAACGACTC
M13R2	CGAGACCTAATACAGCCCC

4.1.4. Vectores de clonación

Los vectores de clonación utilizados se detallan a continuación:

Tabla 5. Vectores utilizados.

Plásmido	Características	Referencia
pGem®-T	Derivado de pGemT [®] -5Zf(+), con las secuencias promotoras T7 y SP6 flanqueando el sitio de clonación múltiple, linearizado con la enzima <i>EcoR</i> V y con una Timina en cada extremo 3'. Permite la clonación de fragmentos de PCR con adenina en sus extremos.	Biotech S.L.
pET SUMO	Vector de expresión para producir altos niveles de proteína soluble en <i>E. coli</i> ; BL21 (DE3). Con las secuencias promotoras T7 y lacO. Confiere resistencia a la Kanamicina (Kan ^R). Usa como tag 6 histidinas unidas a la proteína SUMO.	Thermo Fisher S.L.

4.1.5. Programas de análisis de datos

Para el procesado y manejo de los datos obtenidos durante este trabajo, se utilizaron los siguientes programas informáticos:

Tabla 6. Programas para el análisis de datos.

Programa		Aplicación
BLAST (NCBI)		Búsqueda de secuencias nucleotídicas o proteicas similares a la problema
DNASTar Lasergene versión 7.0	Seqbuilder	Edición y análisis de secuencias nucleotídicas o proteicas
	MegAlign	Alineamiento de secuencias para determinar su identidad
	SeqMan	Gestión de contigs y ensamblaje de secuencias de ADN
Oligo 6 (Mol. Biology Insights Inc., EE.UU.)		Selección de oligonucleótidos en una secuencia problema con las características óptimas
Adobe Illustrator CS3		Elaboración y tratamiento de figuras
Adobe Photoshop CS3		Edición de imágenes
MEGA versión 6 (Tamura <i>et al.</i> , 2013)		Construcción y edición de árboles filogenéticos
Image Lab Software		Captura y análisis de imágenes obtenidas de geles
GraphPad Prism Software, (CA, USA) (versión 6)		Elaboración de gráficas de supervivencia
Bases de datos		Aplicación
Broad Institute <i>Fusarium</i> Comparative Database (http://www.broadinstitute.org)		Búsqueda de secuencias nucleotídicas o proteicas
CBS prediction server (http://www.cbs.dtu.dk/services/)		Predicción de dominios y sitios de modificación post- traduccional de proteínas

4.2. Métodos

4.2.1. Crecimiento y mantenimiento de organismos

4.2.1.1. Hongos

Se utilizó una cepa silvestre de *F. oxysporum* (cepa 4287, CBS 123668, NRRL 34936), una cepa modelo que ha sido utilizada para llevar a cabo estudios genéticos y de patogenicidad en animales y plantas (Ortoneda *et al.*, 2004b).

Los cultivos de *F. oxysporum* se incubaron a 28 °C en el medio nutritivo sólido agar patata dextrosa (PDA; Pronadisa, España). Para la selección de las cepas mutantes generadas durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral, éstas se cultivaron en PDA suplementado con higromicina B (55 µg/mL) ó nusotricina (50 µg/mL), dependiendo del casete de selección utilizado.

Para la obtención de esporas, germínulas o micelio, *F. oxysporum* fue cultivado en el medio líquido PDB (caldo de patata dextrosa) a 28 °C con agitación orbital (170 rpm). Cuando fue necesario se añadió al medio PDB higromicina B (20 µg/mL) ó nusotricina (2,5 µg/mL).

Para la conservación de la cepa silvestre y de las mutantes de *F. oxysporum* se recogieron esporas de un cultivo de 3-4 días en PDB. Para ello el cultivo se filtró a través de nylon (Monodur, diámetro de poro de 10-15 µm) para separar germínulas y micelio. El filtrado se centrifugó a 12.000g durante 10 min, se lavó con agua destilada estéril y se almacenó a -80 °C con 30 % glicerol (v/v). Esta suspensión se utilizó como inóculo para la obtención de esporas frescas en ensayos posteriores.

4.2.1.2 Bacterias

E. coli se cultivó en medio líquido LB a 37 °C con agitación (250 rpm), y en medio sólido en estufa a la misma temperatura, con ampicilina o kanamicina para estirpes portadoras de plásmidos con los genes de resistencia. La conservación de cepas bacterianas durante largos períodos de tiempo se llevó a cabo a -80 °C en medio LB con 30 % de glicerol (v/v). Las células fueron sembradas mediante diseminación por rastrillo en placas de medio agar LB (LA) e incubadas a 37 °C por 24 horas en estufas de cultivo.

4.2.1.3 Plantas

Para las infecciones en la planta del tomate con *F. oxysporum* se usó la cepa Monika (Sygenta, Almería) el cual es un cultivar de tomate sensible a la raza 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Para la obtención de plantas de tomate, las semillas se esterilizaron superficialmente en una solución de hipoclorito sódico al 1 % durante 30

minutos, seguida de 2 lavados de 10 minutos con abundante agua. Una vez escurridas se sembraron cuidadosamente y de manera equidistante sobre una cama de vermiculita (4 μ m) humedecida. Las plantas se incubaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad) a 28 °C. Además, las plantas se regaron con agua de la red según sus necesidades hídricas sin aportaciones nutritivas externas.

4.2.1.4. Macrófagos

Para evaluar la virulencia de las cepas mutantes de *F. oxysporum* se utilizaron células de macrófagos de ratón (BALB/c) J774.1 las cuales fueron mantenidas como células adherentes en frascos de cultivo celular a 37 °C con 5 % de CO₂ en DMEM (medio esencial mínimo de Eagle) (Biowest, Europa) suplementado con L-glutamina con 10 % (p/v) de suero fetal bovino y 1 % de penicilina/estreptomicina.

4.2.2. Estudios in silico

4.2.2.1. Búsqueda *in silico* de genes de interés

La búsqueda de genes relacionados con homeostasis de metales pesados en *F. oxysporum* se realizó mediante el uso de dos bases de datos con el genoma completo de *F. oxysporum*, el Joint Genome Institute (JGI, <https://genome.jgi.doe.gov/Fusox1/Fusox1.home.html>) (Grigoriev *et al.*, 2012; Nordberg *et al.*, 2014) y FungiDatabase (FungiDB, <https://fungidb.org/fungidb/>) (Basenko *et al.*, 2018; Stajich *et al.*, 2012). La búsqueda de identidad entre secuencias nucleotídicas se ha hecho usando la herramienta BLASTn, en la base de datos pública del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4.2.2.2. Análisis de secuencias de ADN o proteicas

El manejo y la comparación de secuencias se llevó a cabo con el paquete DNASTAR Lasergene que incluye diferentes programas bioinformáticos:

- MegAlign (para el análisis y alineamiento de ADN y secuencias de proteínas)
- SeqMan (para la gestión de contigs y el ensamblaje de secuencias de ADN)
- Seqbuilder (para la construcción de los alelos mutantes)

Para la predicción de dominios y de sitios post-traduccionales de las secuencias proteicas se usó el CBS Prediction Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>).

Para evaluar el grado de conservación de la hipotética metalotioneína o de la transportadora de cobre encontradas en el genoma de *F. oxysporum* con otras ya descritas o identificadas como proteínas de resistencia a metales o ATPasas exportadoras de Cu las secuencias aminoacídicas deducidas de los genes de *F.*

oxysporum y los ortólogos de otras especies fúngicas se alinearon mediante el algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). La construcción de los árboles filogenéticos se realizó empleando el método bootstrap no paramétrico con 1.000 repeticiones y el resultado obtenido se representó mediante un cladograma construido con el programa MEGA 6.

4.2.3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

Se procedió a la extracción de ADN de la cepa silvestre de *F. oxysporum* para poder generar las construcciones necesarias para la generación de mutantes. Una vez las cepas mutantes se generaron también se extrajo ADN de las mismas.

4.2.3.1. Purificación de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala

El protocolo utilizado es el descrito por Murray y Thompson (Murray *et al.*, 1980), con algunas modificaciones. Se inoculó una colonia aislada de la estirpe portadora del plásmido de interés en 5 mL de medio selectivo. Después de 12-14 h de incubación, se centrifugaron 3 mL del cultivo durante 3 min a 13.000 rpm. Una vez eliminado el sobrenadante, la muestra de células se resuspendió en 200 µL de solución STET¹. A continuación, se añadieron 4 µL de lisozima (50 mg/mL) para provocar la lisis celular y 2 µL de ribonucleasa A (RNasa) (10 mg/mL) para eliminar el ARN, y se incubó a RT durante 10 min. Seguidamente, la muestra se calentó a 100 °C durante 45 s y se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm. Los restos celulares, que quedaron en el fondo del tubo con aspecto mucoso, se retiraron con un palillo de dientes estéril. Se añadieron 10 µL de CTAB² al sobrenadante para precipitar el ADN y se incubó a RT durante 5 min. Después de centrifugar durante 10 min a 13.000 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 µL de una solución 1,2 M NaCl y 750 µL de 100 % etanol frío. Se homogenizó y se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm. El precipitado se lavó con 70 % etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 20 µL de agua desionizada estéril. Cada muestra de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel de agarosa.

4.2.3.2. Extracción de ADN genómico de *F. oxysporum*

La purificación de ADN se realizó a partir de micelio procedente de un cultivo del hongo de 3-4 días, recogido por filtración a través de nailon Monodur (diámetro de poro 10-15 µm). El micelio se secó con papel de filtro, y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. Se siguió el protocolo de extracción rápida con CTAB descrito por Torres y

¹ **STET:** 8 % sacarosa p/v; 0,1 % Tritón X-100 v/v; 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 8,0.

² **CTAB:** 5 % bromuro de hexadeciltrimetilamonio p/v. Mantener a 37 °C para evitar que precipite.

col. (Torres *et al.*, 1993) con modificaciones. Con ayuda de un mortero se pulverizaron en nitrógeno líquido 100 mg de micelio y se transfirieron a un vial de 2 mL con 1 mL de tampón de extracción CTAB³. Se homogenizó vigorosamente, se añadieron 4 µL de β-mercaptoetanol (Merck) y 500 µL de una solución cloroformo: octanol (24:1, v/v), y se incubó a 65 °C durante 30 min. Posteriormente, se incubó a RT durante 15 min y se centrifugó 5 min a 10.000g. Al sobrenadante se le añadió 1 mL de 100 % etanol frío y se mantuvo a -20 °C durante 10 min. Después se centrifugó 5 min a 7.500g y se lavó dos veces consecutivas con 1 mL de 75 % etanol (v/v). Finalmente, se resuspendió en 50-100 µL de agua desionizada estéril, se añadieron 4 µL de RNasa (10 mg/mL) y se continuó el tratamiento a 37 °C durante 30 min. Cada muestra de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel de agarosa.

4.2.3.3. Extracción de ARN total

La extracción de ARN se realizó a partir del micelio producido en las condiciones adecuadas según el experimento. Para la extracción de ARN, se pulverizaron 100 mg de micelio en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero, y se transfirieron a un vial de 2 mL que contenía 1 mL de Tripure Isolation Reagent (Roche). Se homogenizó vigorosamente y se centrifugó a 4 °C, durante 10 min y 12.000g. El sobrenadante se transfirió a un vial nuevo y se incubó a 0 °C durante 5 min, para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200 µL de cloroformo y se homogenizó vigorosamente durante 15 seg. Posteriormente, se incubó a 0 °C durante 15 min. Después de centrifugar a 4 °C durante 15 min a 12.000g, la solución se separó en tres fases. La fase superior, acuosa e incolora, se transfirió a un vial limpio, al que se le añadieron 500 µL de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a 0 °C durante 10 min. A continuación, se centrifugó a 4 °C durante 10 min y 12.000g para recoger el ARN precipitado. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 mL de 75 % etanol (v/v). Finalmente, se centrifugó a 7.500g, a 4 °C durante 5 min, se secó, se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNasas y se incubó a 55-60 °C durante 10-15 min. Cada muestra de ARN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó su calidad mediante visualización en gel al 1 % agarosa (p/v).

³Tampón de extracción CTAB: 12,1 g/L Trizma base; 7,44 g/L EDTA; 81,8 g/l NaCl y 20 g/L bromuro dehexadeciltrimetilamonio. Para disolver se calentó a 60 °C y ajustó a pH 8,0 con NaOH. Se llevó a 100 mL y se almacenó a 37 °C para evitar que precipitara.

4.2.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

4.2.4.1. Geles de agarosa

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa) disuelta en tampón TAE⁴. La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos que se querían separar, oscilando entre 0,7 y 2 % (p/v). Para visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Cada muestra se mezcló con tampón de carga para geles de agarosa⁵ en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 V/cm.

4.2.4.2. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para la recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa, se emplearon los kits comerciales: illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) o Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, EE.UU.).

Detallaremos el protocolo seguido para el primer kit nombrado:

1. Pesar un tubo eppendorf vacío.
2. Recortar con un bisturí el fragmento de agarosa que contiene el ADN de interés e introducirlo en el eppendorf (previamente pesado).
3. Pesar el eppendorf que contiene la banda de agarosa y calcular el peso del fragmento de gel.
4. Añadir 10 µL de *Capture buffer type 3* por cada 10 mg de gel.
5. Mezclar por inversión e incubar a 60 °C durante 15-30 min hasta que la agarosa este completamente disuelta.
6. Transferir la muestra que incluye el buffer con el gel disuelto a una columna *GFX MicroSpin* contenida en un tubo colector en un volumen máximo de 800 µL (repetir hasta cargar toda la muestra).
7. Incubar a temperatura ambiente (TA) durante 1 min.
8. Centrifugar a 16.000g durante 30 seg. Descartar el sobrenadante acumulado en el tubo colector.
9. Añadir 500 µL del *Wash buffer type 1* a la columna y volver a centrifugar (mismas condiciones que en el paso 8).

⁴ **Tampón TAE:** 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA pH 8,0.

⁵ **Tampón de carga para geles de agarosa:** 0,25 % azul de bromofenol p/v; 0,25 % azul de xilencianol p/v y 40 % sacarosa p/v en 5x TAE.

10. Descartar el tubo colector y transferir la columna a un eppendorf nuevo.
11. Añadir 10-50 μL de ddH₂O en el centro de la membrana de la columna depositada en el eppendorf.
12. Incubar a TA durante 1 min.
13. Centrifugar a 16.000g durante 1 min.
14. El ADN purificado concentrado en el eppendorf se almacena a -20 °C (descartar la columna).

4.2.5. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN, se incluyó en los geles de agarosa el marcador de tamaño GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher S.L.), que contiene fragmentos desde 75 pb a 20 kb. La captura y el análisis de imágenes obtenidas de geles se realizó mediante el software Image Lab™.

Finalmente, la concentración de muestras de ADN y de ARN se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop® 2000 (*ThermoScientific*, EE.UU.), a 260 nm. En algunas ocasiones se comparó la intensidad de las bandas con cantidades conocidas del marcador de tamaño molecular.

4.2.6. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos

4.2.6.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por Roche. Los tratamientos del ADN con una o dos enzimas de restricción se realizaron en el tampón y a la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Se emplearon 100 ng/ μL de ADN plasmídico y 1-2 unidades de enzima por microgramo de ADN, sin que el volumen añadido superara nunca el 10 % del total. En el caso de los tratamientos de ADN genómico (ADNg) para análisis Southern, se trataron 3 μg de ADN con cada enzima. Las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima durante 2- 3 h.

En los tratamientos con dos enzimas que no actúan en el mismo tampón, se añadió primero la enzima cuyo tampón contenía menor concentración salina, y se dejó actuar al menos 1 h. A continuación, se añadieron las sales necesarias para el funcionamiento óptimo de la segunda, así como la propia endonucleasa, y se prolongó la incubación durante otros 60 min a su temperatura óptima de reacción.

Las enzimas de restricción se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por choque térmico o añadiendo el tampón de carga.

4.2.6.2. Unión de fragmentos de ADN

Para la unión de fragmentos de ADN a vectores linearizados se utilizó la ADN ligasa del fago T4 (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante (normalmente una relación molecular 3:1 de inserto y vector). Para fragmentos de ADN amplificados por PCR, se empleó el kit comercial pGEM®-T Vector System (Biotech) o el pET SUMO (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes. Antes de su unión los productos de PCR se purificaron precipitando con etanol.

4.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa

4.2.7.1. PCR estándar

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo en un termociclador y, según la finalidad del experimento, se emplearon polimerasas termoestables (BIOTAQ™ DNA polymerase de Bioline o Expand High Fidelity de Roche), en las condiciones de reacción indicadas en las instrucciones de uso del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo con 300 nM de cada uno de los dos cebadores empleados, la concentración de $MgCl_2$ adecuada, 0,8 mM de la mix de dNTPs y $0,05\text{ U }\mu\text{L}^{-1}$ de polimerasa. La cantidad de ADN molde empleada fue de entre $5\text{-}10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ de ADNg y de $1\text{-}5\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ de ADN plasmídico. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones de amplificación se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de amplificación para PCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	35 seg	35
Hibridación	Según cebador	35 seg	
Extensión	72/68 °C	1 min kb ⁻¹	
Extensión final	72/68 °C	7 min	1

4.2.7.2. PCR de marcaje

En los análisis de hibridación Southern se emplearon sondas bicatenarias marcadas con digoxigenina dUTP. El marcaje se realizó por PCR empleando los cebadores y dNTPs de DIG DNA Labeling Mix (Roche), que contiene una mezcla de digoxigenina-dUTP y el resto de dNTPs sin marcar. Para las sondas bicatenarias se realizó una PCR estándar (30 ciclos) en la que se sustituyeron los dNTPs por la DIG DNA Labeling Mix. La purificación de la sonda se realizó con cloruro de litio (apartado 4.2.7.4.B).

4.2.7.3. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR)

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado (3 repeticiones técnicas a partir de 3 réplicas biológicas). Se usaron placas de 96 pocillos (BioRad) en un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

Para la medición de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real se añadió por cada reacción 5 µL de ADNc diluido en agua desionizada estéril (1:1) con alícuotas de una misma mezcla. La cuantificación del número de copias en el genoma (CNVs) en los distintos casos se realizó a través de qPCR con 5 µL ADNc de calidad suficiente y diluido hasta 15 ng/µL. Las condiciones de amplificación para ambos casos se detallan en la siguiente tabla 8:

Tabla 8. Condiciones de amplificación para qPCR.

Reacción	Componente	Concentración [] inicial	Volumen (µl)	[] final
PCR	cDNA		5 dil. en H ₂ O 1:1	
	iQ SYBR Green Supermix		7.5	1X
	Oligonucleótido F (5')	15 pmol	0.3	0.3 µM
	Oligonucleótido R (3')	15 pmol	0.3	0.3 µM
Vf = 15 µL				
Amplificación	Desnaturalización inicial: 95 °C 10 min Desnaturalización: 95 °C 10 sec Hibridación: 64 °C 10 sec Extensión: 72 °C 20 sec Determinación de fluorescencia: 80 °C			

Para analizar los productos obtenidos tras las PCRs se realizaron las curvas de desnaturalización (*Curvas de Melting*). Para ello se programó el equipo para aumentar 0,5 °C cada 5 segundos, comenzando en 65 °C hasta alcanzar los 95 °C, donde se determinó la fluorescencia tras cada aumento de temperatura. El cálculo de la eficiencia (E) de las reacciones de qPCR, se realizó mediante diluciones seriadas del ADNc que fueron empleadas como moldes en reacciones de amplificación. El valor E se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida tras representar el logaritmo en base 10 de la cantidad de ADNc utilizada para la amplificación frente al ciclo umbral (Ct) de amplificación, según la ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Los niveles de expresión relativa se calcularon siguiendo el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak *et al.*, 2001; Pfaffl, 2001) normalizando los datos frente al gen de referencia actina. Los valores de C_t obtenidos fueron considerados como válidos si la dispersión de los datos de cada triplicado era tal que su desviación típica fuera menor a 0,1.

$$R_p = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_p} - C_{t_c})_{Tto} - (C_{t_p} - C_{t_c})_{Ref}$$

Donde:

- **R_p** : Expresión relativa del gen en estudio con respecto a gen control
- **C_{t_p}** : Ciclo umbral del gen en estudio
- **C_{t_c}** : Ciclo umbral del gen control
- **Ref** : Condiciones de referencia
- **Tto** : Condiciones de tratamiento

4.2.7.4. Precipitación de productos de PCR amplificados

A. Precipitación con etanol

La precipitación de los fragmentos de ADN se utilizó para productos de PCR únicos, con el fin de eliminar el tampón, la polimerasa y los dNTPs sobrantes. Para ello, se añadió en este orden 1/10 del volumen a precipitar de 3 M de acetato de sodio pH 5,2 y 2,5 vol de etanol. Se incubó a RT durante 30 min y se centrifugó durante 30 min a 12.100g. Después de eliminar el sobrenadante el sedimento se lavó dos veces con 70 % etanol (v/v) y se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

B. Precipitación con Cloruro Litio

Al producto de PCR marcado se le añadieron 10 % de una solución 8 M de cloruro de litio (v/v) y 3 vol de 100 % etanol frío. Se incubó a -20 °C durante 30 min y se centrifugó 30 min a 12.000g. Posteriormente se lavó con 70 % etanol (v/v), se secó y se resuspendió en 10 µL de agua desionizada.

4.2.8. Transcripción reversa del ARN (RT-PCR)

4.2.8.1. Eliminación de restos de ADN

El ARN purificado se trató con DNAsa I (Fermentas) durante 30 min a 37 °C, a 0,1 µg/µL de ARN y 0,1 U/µL de enzima. Para detener la acción de la DNAsa la mezcla se incubó a 65 °C durante 10 min, añadiendo EDTA a concentración final 2,5 mM para prevenir la hidrólisis del ARN durante el calentamiento.

4.2.8.2. Síntesis de ADN copia

Para la síntesis de ADN copia (ADNc), el ARN tratado con DNAasa I se sometió a transcripción inversa usando la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). En un volumen final de 20 μ L se mezcló 1 μ g de ARN total con 100 pmol de oligodT y se desnaturalizó a 70 °C durante 10 min. A continuación, se mantuvo en hielo y se añadieron 0,4 mM de dNTPs, 1x tampón First Strand Buffer (Invitrogen), 4 U/ μ L del inhibidor de RNAsas RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega) y 5 mM de Ditioneitol (DTT). A continuación, se incubó a RT durante 10 min y, transcurrido ese tiempo, se añadió la retrotranscriptasa (10 U/ μ L). Se incubó la reacción a 37 °C durante 50 min y finalmente se calentó a 70 °C durante 15 min, para inactivar la enzima.

4.2.9. Transformación genética

4.2.9.1. Transformación de *E. coli*

Se obtuvieron y transformaron bacterias competentes para guardar ADN genómico de interés para la generación de la cepas mutantes, lo cual se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1985) con algunas modificaciones que se describen a continuación.

A. Obtención de células competentes

Una colonia fresca de *E. coli* DH5 α se inoculó en 5 mL de PSI-b⁶ y se incubó durante 12 h a 37 °C con agitación. El cultivo estacionario se transfirió a 100 mL de PSI-b en un matraz de 1 L (precalentado a 37 °C) y se incubó con agitación vigorosa hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a una absorbancia de 550 nm. A continuación, el cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó a 4 °C durante 5 min a 5.000g.

Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 mL de solución Tfb-1⁷ fría. Después de incubar 5 min en hielo, se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 5.000g, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 mL de solución Tfb-2⁸ fría. Por último, se enfrió en hielo durante 15 min, se repartieron en alícuotas de 100 μ L en viales previamente enfriados y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

⁶ **PSI-b:** 5 g/L extracto de levadura; 20 g/L triptona y 5 g/L MgSO₄ 7 H₂O. Ajustar a pH 7,6 con KOH. Esterilizar en autoclave.

⁷ **Solución Tfb-1:** 30 mM acetato potásico pH 6,9; 50 mM MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂ y 15 % glicerol v/v. Esterilizar por filtración.

⁸ **Solución Tfb-2:** 10 mM MOPS pH 7,0; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl y 15 % glicerol (v/v). Esterilizar por filtración.

B. Transformación de células competentes

Las células competentes se descongelaron en hielo. Se mezclaron alícuotas de 50 μ L con 5 μ L de la solución con el ADN y se incubaron 30 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 90 seg y se dejaron en hielo 5 min. Las células transformadas se incubaron a RT y sin agitación durante 15 min con 100 μ L de medio LB para permitir la expresión del gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Por último, toda la mezcla de transformación se esparció en placas de medio selectivo, que se incubaron a 37 °C durante 12-14 h. En el caso de plásmidos con resistencia a otros antibióticos, las células se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 h en 1 mL de medio LB. Posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en 150 μ L de medio LB, se repartieron en placas de medio selectivo y se incubaron a 37 °C durante 12-14 h.

4.2.10. Transformación genética de *F. oxysporum*

A. Obtención de protoplastos

La generación de cepas defectivas en los genes *mt1* y *crpF* se realizó mediante la inserción de ADN exógeno en células fúngicas en las que su pared celular se encontraba debilitada, conocidas como protoplastos. Los protoplastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Powell y col. (Powell *et al.*, 1990) con modificaciones. Se inocularon 10^9 microconidias frescas en 200 mL de PDB. Después de 12-14 h de incubación a 28 °C con agitación a 170 rpm, se recogieron las germinulas por filtración en nailon Monodur (10-15 μ m) y se lavaron con abundante solución OM⁹. A continuación, se recogieron con una espátula estéril y se resuspendieron en 20 mL de OM con 10 % (p/v) de una mezcla comercial de enzimas líticas de paredes celulares fúngicas Extralyse (Laffort, Bordeaux, France). El tratamiento enzimático se prolongó durante 2 h 30 min a 30 °C y agitación suave. Transcurrido este tiempo la formación de protoplastos se comprobó al microscopio. Cuando el número y la calidad de los protoplastos fueron adecuados, se filtró la muestra a través de dos capas de nylon Monodur (10-15 μ m) y se lavó con STC¹⁰ frío. Posteriormente, se centrifugó a 4 °C y a 1.500g durante 15 min para recoger los protoplastos. Éstos se resuspendieron suavemente en 1 mL de STC y se determinó su concentración utilizando una cámara Neubauer. Se repartieron en alícuotas de 100 μ L a una concentración de 2×10^8 protoplastos mL⁻¹. A continuación, se procedió a su

⁹ **Solución OM:** 1,2 M MgSO₄; 10 mM Na₂HPO₄, pH 5,8-6,0 ajustado con ácido ortofosfórico.

¹⁰ **Solución STC:** 0,8 M sorbitol; 50 mM CaCl₂ y 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.

transformación o a su almacenamiento a -80 °C, después de añadirles 10 % de solución PEG¹¹ (v/v) y 1 % de DMSO (Merck) (v/v).

B. Transformación de protoplastos

Los protoplastos de la cepa silvestre fueron transformados para la generación de las cepas mutantes mediante la introducción de las construcciones generadas (explicadas en el apartado 4.6.). Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Malardier y col. (Malardier *et al.*, 1989) con algunas modificaciones.

En un vial se mezclaron 1-2 µg de ADN transformante con 10 µL de ácido aurintricarboxílico (inhibidor de nucleasas) y se llevó hasta un volumen final de 60 µL con solución TEC¹². La mezcla se incubó en hielo durante 20 min, al igual que los protoplastos para ser transformados. Transcurrido este tiempo, se mezclaron suavemente la solución de ADN y los protoplastos y se incubaron 20 min en hielo. Seguidamente se añadieron 160 µL de solución PEG y se prolongó la incubación a TA durante 15 min antes de añadir 1 mL de STC. Se centrifugaron 5 min a 604g para recoger los protoplastos y se resuspendieron en 200 µL de STC. Posteriormente se mezclaron alícuotas de 50 µL de protoplastos con 3 mL de agar de cobertura¹³ a 45 °C, y se repartieron en placas de Petri con medio de regeneración. Se incubaron a 28 °C durante un período de tiempo variable en función del antibiótico de selección, para permitir la expresión del ADN transformante. Para la selección con higromicina B se incubaron durante 14 h, y para la selección con nusotricina durante 3 h. Transcurrido este tiempo se añadieron 3 mL de agar de cobertura con el antibiótico de selección. Por último, se prosiguió la incubación a 28 °C hasta la aparición de colonias.

Los transformantes obtenidos se replicaron a un nuevo medio selectivo para la obtención de colonias puras originadas a partir de una única microconidia, y se realizaron dos ciclos sucesivos de siembra de esporas aisladas y recolección de su descendencia de manera individualizada.

C. Complementación genética de mutantes

Los protoplastos de las cepas mutantes fueron transformados para la generación de las cepas complementadas mediante la introducción del alelo silvestre (2 µg) y un casete de resistencia a un antibiótico (1 µg) mediante cotransformación. De este modo se espera la integración heteróloga del alelo silvestre. Para ello se amplificaron por

¹¹ **Solución PEG:** 60 % polietilenglicol Mw 6.000 (p/v) en 0,6 M MOPS.

¹² **Solución TEC:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA y 40 mM CaCl₂.

¹³ **Agar de cobertura:** 0,4 % agar (Oxoid) (p/v) en medio de regeneración.

PCR el gen diana, incluyendo la región promotora y la terminadora, usando ADN_g de *F. oxysporum* como molde, y el casete de resistencia a partir del vector de clonación adecuado, usando parejas de oligonucleótidos específicos.

4.2.11. Construcción de cepas mutantes de *F. oxysporum*

4.2.11.1. Deleción dirigida de genes de interés

La obtención de mutantes deficientes en los genes de interés se realizó mediante reemplazamiento génico dirigido usando la técnica *Split Marker* (Catlett *et al.*, 2003). Esta técnica consistió en reemplazar a través de una recombinación homóloga la fase codificante del gen de interés por dos construcciones de ADN con secuencias solapantes en el marcador de resistencia.

Para la interrupción de los genes *mt1* y *crpF* se siguió el siguiente protocolo:

1. Se realizó una PCR del gen marcador (gen de resistencia a higromicina B, Hyg^R) contenido en el vector pGem®-T, utilizando los oligonucleótidos M13F y M13R (Tabla 4).
2. Seguidamente se realizaron dos PCRs independientes sobre ADN_g del hongo para amplificar las secuencias flanqueantes del gen a interrumpir mediante oligonucleótidos específicos (Tabla 3). Los cebadores para la amplificación del extremo 5' de *mt1* fueron Mt1-9n y Mt1-2 M13F, este último con una cola complementaria al casete Hyg^R. Los cebadores para la amplificación del extremo 3' de *mt1* fueron Mt1-3 M13R que contiene una cola complementaria al casete Hgr^R y Mt1-4. Los cebadores para la amplificación del extremo 5' de *crpF* fueron CrpF-F1 y CrpF-M13F-R1, este último con una cola complementaria al casete de resistencia a Hyg^R. Los cebadores para la amplificación del extremo 3' de *crpF* fueron CrpF-M13R-F3 que contiene una cola complementaria al casete Hyg^R y CrpF-R2.
3. Se realizaron dos nuevas PCR para la fusión de un fragmento del gen de resistencia a higromicina con los extremos 5' y 3' amplificados de cada gen. Para ello se realizó una primera PCR con la secuencia promotora del gen diana al extremo 3' del casete Hyg^R (para el gen *mt1* se utilizaron los oligonucleótidos Mt1-9n y Hyg-G; y para el gen *crpF* se utilizaron los oligonucleótidos CrpF-F2n y Hyg-G). Se realizó una segunda PCR con la secuencia terminadora del gen con la secuencia 5' del casete de resistencia (para el gen *mt1* se utilizaron los oligonucleótidos Hyg-Y y Mt1-11n; y para el gen *crpF* se utilizaron los oligonucleótidos Hyg-Y y CrpF-R3n). De este modo, cada construcción era portadora de aproximadamente el 75 % de cada extremo del casete de

resistencia, incluyendo una región idéntica en ambas construcciones (Carroll *et al.*, 1994).

4. Una vez generados los dos fragmentos solapantes para interrumpir el gen de interés mediante *Split marker* se procedió a su clonación en el vector pGEM®-T.
5. Los fragmentos 1 y 2 solapantes para cada gen, amplificados por PCR y clonados en pGEM®-T se usaron para transformar células competentes DH5 α (apartado 4.2.9.1.B).
6. Seguidamente, los fragmentos clonados en pGEM®-T y guardados en las células competentes se usaron para transformar protoplastos de la estirpe silvestre de *F. oxysporum* (apartado 4.2.10.B), empleando las dos construcciones solapantes obtenidas anteriormente. La recombinación esperada se da por sustitución homóloga del gen diana por el casete Hyg^R, es decir, debe haber dos eventos de recombinación homóloga en una misma célula, uno con cada construcción. De esta forma se obtendrá un transformante con el gen diana sustituido y el casete Hyg^R completo dotándolo de resistente a higromicina.

4.2.11.2. Selección y verificación de las cepas mutantes y complementadas

Una vez obtenidas las cepas a partir de los medios selectivos (suplementados con Higromicina o Nusotricina) se confirmó que habían adquirido el correspondiente casete de resistencia por sustitución del gen diana (recombinación homóloga) mediante análisis Southern blot. Asimismo, la correcta inserción del gen diana ectópicamente en las cepas mutantes también se corroboró por Southern.

4.2.12. Hibridación y detección de ácidos nucleicos

Transferencia y fijación del ADN a membranas de nailon para análisis Southern

Tras el tratamiento con endonucleasas de restricción y transcurrida la electroforesis, el gel se fotografió y se trató para la desnaturalización del ADN y su posterior hibridación. Los tratamientos se llevaron a cabo a TA, con agitación suave y por duplicado. Primero se sometió el ADN a despurinización ácida (hidrólisis parcial) sumergiendo el gel en 0,25 N HCl durante 15 min. A continuación, se desnaturalizó con 0,5 N NaOH:1,5 M NaCl, durante 15 min. Finalmente se neutralizó sumergiendo el gel en 0,5 M Tris pH 7,5:1,5 M NaCl. A continuación, el ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche).

La transferencia se llevó a cabo en una bandeja con una solución 10X SSC¹⁴ sobre la que se colocaron, por orden: una bandeja de electroforesis invertida, cuatro piezas de papel de filtro del tamaño del gel empapadas en la solución 10X SSC, tres piezas de papel Whatman 3MM (humedecidas en 10X SSC), el gel de agarosa, la membrana de nailon humedecida en 3X SSC, tres piezas de papel Whatman 3MM empapadas en 3X SSC, tres piezas de papel Whatman 3MM secas, una pila de 10 cm de servilletas de papel, una placa de cristal y un peso de 0,5 kg.

Todo ello se dispuso eliminando las posibles burbujas de aire que pudieran quedar entre el papel Whatman 3MM y el gel, o entre el gel y la membrana de nailon. La transferencia se prolongó durante 12 h a TA. Finalmente, la fijación del ADN a la membrana se realizó a 80 °C durante 90 min.

Prehibridación

Para los análisis Southern, la membrana con el ADN fijado se incubó a 50 °C durante 1 h con 0,3 mL/cm² de membrana de agente de bloqueo DIG Easyhyb (Roche). Para la preparación del agente de bloqueo se siguieron las instrucciones del fabricante.

Hibridación

La hibridación se realizó a 50 °C durante 12 h con 0,3 mL/cm² de membrana de solución de hibridación¹⁵. Para desnaturalizar la sonda previamente a su uso, la solución de hibridación se incubó a 100 °C durante 10 min y se enfrió rápidamente en hielo durante 5 min. Tras su uso, la solución de hibridación se conservó a -20 °C para su posterior reutilización (hasta tres veces), desnaturalizándose previamente.

Lavados y detección

Una vez retirada la solución de hibridación, los filtros se lavaron dos veces con 2X SSC: 0,1 % SDS (v/v) a TA durante 5 min y con agitación. A continuación, se realizaron otros dos lavados de 15 min a 50 °C con una solución precalentada de 0,5X SSC: 0,1 % SDS (v/v). Posteriormente se equilibró con tampón 1¹⁶ (0,5 mL/cm² de membrana) a RT durante 2-5 min, y se bloqueó con tampón 2¹⁷ (1 mL/cm² de membrana), a RT durante 30 min. La incubación con tampón 2 (0,2 mL/cm² de membrana), conteniendo el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (750 U/mL, Roche)

¹⁴ **Tampón 10x SSC:** 1,5 M NaCl y 0,15 M citrato sódico pH 7,0.

¹⁵ **Solución de hibridación:** 25 ng/mL de sonda marcada con digoxigenina en solución de prehibridación.

¹⁶ **Tampón 1:** 0,1 M ácido maleico y 0,15 M NaCl pH 7,5.

¹⁷ **Tampón 2:** 1 % agente de bloqueo de Roche (p/v) en tampón 1.

diluido 1:20.000, se realizó a RT durante 30 min. A continuación, se lavó dos veces la membrana durante 15 min con tampón 1 (1 mL/cm² de membrana) conteniendo 0,3 % Tween 20 (v/v) y se equilibró con tampón 3¹⁸ (0,2 mL/cm² de membrana) durante 15 min.

La detección se llevó a cabo por la acción enzimática de la fosfatasa alcalina sobre el sustrato CDP-Star^{®19} (Roche) que da una señal quimioluminiscente. Para ello, se colocó la membrana sobre una pieza de acetato y se le añadió la solución CDP-Star^{®20} (1 mL/100cm² de membrana). Posteriormente, la membrana se cubrió con otra pieza de acetato y se retiró el exceso de líquido. Finalmente, se capturó la imagen emitida con la cámara oscura Fujifilm LAS-3000.

4.2.13. Inducción de *F. oxysporum* en presencia de metales pesados para estudios de expresión

Para ello se inocularon esporas frescas en medio PDB y se incubaron durante 12 h con 170 rpm de agitación a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se recogieron las germínulas por filtración a través de nailon Monodur (diámetro de poro de 10-15 µm), se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en 1 mL de agua estéril. A continuación, se alicuotaron 250 µL en matraces con 25 mL de medio SM (control) o suplementados con metales, (7,5 mM ZnCl₂, 0,175 CuSO₄ y 0,1 mM CdCl₂). Transcurridas 6 horas, se recogió el micelio utilizando un filtro de nailon, se lavó con ddH₂O, se secó con papel de filtro y se almacenó rápidamente a -80 °C hasta su utilización.

4.2.14. Clonación de FoxyMt1 y subclonación en vector de expresión

El producto de PCR amplificado correspondiente al ADNc de Mt1 de *F. oxysporum* fue clonado en el vector pGEM[®]-T usando los cebadores Mt1-14 y Mt1-15. Los partidores fueron diseñados en base a la secuencia nucleotídica de *mt1*, de tal forma que se amplificó la fase de lectura abierta (ORF) del gen. Posteriormente, el vector clonado fue transformado en células competentes de *E. coli* DH5α. La selección de los clones se realizó según crecimiento en presencia de ampicilina junto con diferenciación entre colonias blanco/azul mediante la adición de X-gal. Un número de 10-20 colonias, correspondientes a los clones blancos, fueron escogidas al azar, sembradas en 3 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 16 horas en agitación a 250

¹⁸ **Tampón 3:** 0,1 M Tris-HCl y 0,1 M NaCl pH 9,5.

¹⁹ **CDP-Star[®]:** disodio de 4-cloro-3-(metoxispiro (1,2-dioxetano-3,2-(5-cloro) tríciclo [3.3.1.1^{3,7}] decan)-4-il) fenil fosfato.

²⁰ **Solución CDP-Star[®]:** 1 % en tampón 3 (v/v).

rpm. Posteriormente, los clones fueron centrifugados a 3.000g durante 15 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado y el pellet bacteriano obtenido fue utilizado para purificación del ADN plasmídico mediante lisis alcalina (apartado 4.2.3.1.).

La presencia del ADNc que codifica para *mt1* presente en el vector pGEM®-T clonado fue evaluada mediante amplificación por PCR del gen *mt1* usando los cebadores Mt1-14 y Mt1-15. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7 % y teñidos con bromuro de etidio. La purificación de los fragmentos de ADN de *mt1* de los clones positivos (amplificación mediante PCR de fragmento de 336 pb) a partir de geles de agarosa fue realizada utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La ORF correspondiente a *mt1* que previamente fue amplificada por PCR, fue subclonada en un vector pET-SUMO (Invitrogen) para expresión bacteriana en células de *E. coli*. De esta forma, los constructos recombinantes fueron expresados como una proteína de fusión con un Tag de 6 His en la región N-terminal junto con la adición de la proteína SUMO (correspondiente a la proteína Smt3 de *Sacharomyces cereviceae*, de 11 kDa con actividad tipo ubiquitina, homóloga a la proteína SUMO-1 de mamíferos y miembro de una familia tipo ubiquitina), la cual permite aumentar los niveles de expresión, así como la solubilidad de las proteínas recombinantes (figura 7). La ligación de los productos de PCR de *mt1* fue realizada utilizando la enzima T4 DNA ligasa y una relación vector pET -SUMO/Producto PCR de 1:1.

Posteriormente los constructos de expresión fueron transformados en células competentes *E. coli* BL21 (DE3), sometidos a shock térmico a 42 °C por 30 seg, seguido de incubación a 37 °C por 1 h a 250 rpm en medio SOC. A continuación, la reacción de transformación entera se inoculó en 10 mL de LB conteniendo 25 µg/mL de kanamicina e incubados a 37 °C y 250 rpm de agitación durante toda la noche (pre-inóculo). Al siguiente día se procedió a la expresión piloto de los clones transformados.

La inserción de la secuencia del ADNc del gen *mt1* en su correcta fase de lectura fue comprobado mediante secuenciación. El software SeqMan versión 7.0.0 (DNASTAR Lasergene, USA) se usó para la gestión de contigs y el ensamblaje de secuencias de ADN. El objetivo consistió en obtener una secuencia consenso de la secuenciación de al menos 3 clones diferentes que expresasen la proteína MT1.

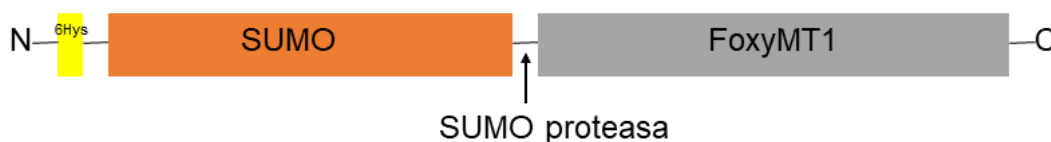


Figura 7. Esquema del constructo para Mt1.

4.2.15. Manipulación de proteínas

4.2.15.1. Expresión de rFoxyMT1 o de los complejos rFoxyMT1-metal

El clon seleccionado mediante secuenciación, fue utilizado para expresión piloto de la proteína recombinante rFoxyMT1. Los pre-inóculos del día anterior (500 μ L) (apartado 4.2.14.) fueron inoculados en 10 mL de medio LB conteniendo 25 μ g/mL de kanamicina y cultivado a 37 °C durante 1h 15 min con agitación (250 rpm) hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,3$. Seguidamente, se inició la expresión piloto:

- Los cultivos fueron crecidos sin inducir o inducidos (más IPTG, a diferentes concentraciones 0,3-1 mM)
- Los cultivos fueron monitoreados desde el tiempo 0 hasta 7 horas. Desde el tiempo 0 y cada hora se guardaron alícuotas de 500 μ L, se centrifugaron a 3.000g durante 30 seg para luego almacenar los pellets correspondientes a -20 °C. Los pellets bacterianos fueron corridos en SDS-PAGE al 12 % y las proteínas visualizadas con tinción de Coomassie blue.

Mediante la expresión piloto se corroboró que las condiciones más óptimas para la expresión de rFoxyMT1 fueron durante 7 horas, a 25 °C, con 0,3 mM de IPTG y con agitación (250 rpm).

El clon que dio positivo mediante secuenciación se inoculó en 50 mL de LB + 25 μ g/mL de kanamicina y se incubó durante toda la noche (ON) a 37 °C y con agitación (250 rpm). Pasadas las 12 h, se inoculó 1 mL del pre-inóculo en 50 mL LB + 25 μ g/mL de kanamicina (se utilizaron volúmenes mayores para los ensayos de síntesis del complejo rFoxyMT1-metal). Se incubó a 37 °C y a 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{600nm} \approx 0,3$ (1h 15 min aprox.). Seguidamente, se añadieron 0,3 mM de IPTG para inducir la expresión de la proteína, y cuando fue necesario media hora después se añadieron los metales (0,3 mM $ZnCl_2$, 0,3 mM $CdCl_2$, 0,5 mM $CuSO_4$). Se dejó crecer el cultivo a 25 °C a 250 rpm durante 7 horas. Pasado este tiempo se centrifugó a 20.000g durante 20 min a 4 °C. Se resuspendió la bacteria en el buffer de lisis (50 mM fosfato de potasio pH 7,8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % glycerol, 0,5 % Triton X-

100), se agregó 1 mg/mL de lisozima, se mezcló bien y se incubó en hielo durante 30 min. Seguidamente, se realizaron diferentes ciclos de sonicación de 10 seg cada uno, manteniendo las muestras en hielo. Se centrifugó a 20.000g durante 20 min a 4 °C. Y se guardaron el pellet y el sobrenadante de lisis a -80°C.

4.2.15.2. Purificación de rFoxyMT1 o de los complejos rFoxyMT1-metal

La purificación de la proteína recombinante Mt1 soluble, fue realizada por el sistema Ni-NTA Purification System (Invitrogen). La purificación se realizó mediante condiciones nativas utilizando el procedimiento de incubación con la resina por baño. Para esto, se procedió a preparar la resina de Ni-NTA Agarosa para posterior purificación de la proteína recombinante.

Así, 2 mL de la resina (este volumen fue mayor para los ensayos de síntesis del complejo metal-proteína) depositados en un tubo cónico de 50 mL fueron centrifugados a 2900 rpm durante 1 min, el sobrenadante descartado y luego se realizaron varios lavados con 9 mL de ddH₂O estéril y a continuación nuevamente centrifugaciones a 800g por 1 min. El sobrenadante fue descartado y la resina fue resuspendida y equilibrada con 6 mL de buffer de unión (100 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol); a continuación fue centrifugada a 2900 rpm durante 1 min, el sobrenadante fue descartado y finalmente la resina fue resuspendida en 2 mL de buffer de unión.

Un volumen de 8 mL del sobrenadante del lisado celular de la expresión de Mt1 fue agregado secuencialmente a la resina de Ni-NTA Agarosa previamente equilibrada. La resina junto a los lisados celulares fueron incubados por 1 hora en agitación orbital y en hielo.

Posteriormente, la mezcla de purificación fue centrifugada a 2900 rpm durante 1 min y el sobrenadante fue recuperado y almacenado a 4 °C para su posterior evaluación mediante SDS-PAGE. A continuación, la resina unida a la proteína recombinante fue lavada en cada caso, 3 veces con 5 mL de buffer de lavado (100 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol), centrifugada a 2900 rpm durante 1 min y el sobrenadante recuperado.

Finalmente, cada proteína recombinante fue eluída con 5 mL del buffer de elusión (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol) por duplicado. Primero, se añadieron 5 mL del buffer de elusión, se incubaron en hielo y en agitación orbital durante 30 min, se centrifugaron a 2900 rpm durante 1 min y se guardó el eluido en hielo. Se realizó el mismo procedimiento con los otros 5 mL de eluido. Finalmente, en dos tandas el tampón de los eluidos fue intercambiado por PBS y concentrado

utilizando tubos amicon ultra-15 10 kDa (Millipore, Merck). Las centrifugaciones del tubo amicon mencionado se realizaron a 4000g durante 10-15 min aproximadamente.

4.2.15.3. Determinación de la concentración de proteína

Para la cuantificación de proteína se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976) utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Este método se basa en la reacción colorimétrica entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie (BioRad, Hercules, USA) con grupos amino libres de los aminoácidos básicos en las proteínas (arginina, lisina e histidina). El valor de absorbancia a 595 nm indica la concentración de proteína presente, extrapolado a partir de una recta patrón. Para la elaboración de esta recta se utilizó una disolución de BSA de concentración conocida (2 mg mL^{-1}) y un mínimo de 6 diluciones seriadas entre $0,2$ y $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en el reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad). Para la cuantificación de la proteína se procedió igualmente añadiendo el mismo volumen de extracto en el reactivo Bradford y tras 15 min en oscuridad se determinó la absorbancia a 595 nm.

4.2.15.4. Tratamiento enzimático con SUMO proteasa

La digestión de proteínas recombinantes fusionadas a SUMO se realizó con la enzima SUMO proteasa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), para lo que se requieren 20 unidades de SUMO proteasa para la digestión de 1 mg de proteína. La digestión se mantuvo en el termobloque a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2h. Posterior a la digestión se purificó de nuevo la proteína para separarla de la cola y de la enzima las cuales se quedaron adheridas a la resina.

El mismo volumen de resina (previamente lavada con PBS 1X) que de producto de digestión se pusieron en contacto en un tubo eppendorf, en agitación orbital, hielo, durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla de purificación se centrifugó a 800g por 1 min y el sobrenadante se recuperó y la resina fue descartada. El sobrenadante recuperado fue concentrado mediante un amicon ultra-0,5 mL 3 kDa (Millipore, Merck).

4.2.15.5. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas se visualizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE en gel al 12 %. Esta técnica permite separar péptidos en función de su tamaño.

A. Preparación de muestras

Las muestras a analizar se mezclaron con tampón de carga para proteínas SBL5X²¹, en un volumen final 15 µL. La mezcla de la muestra más el tampón de carga se mantuvo a 100 °C durante 5 min y después 2 min en hielo para que tuviese lugar la desnaturalización de las proteínas.

B. Preparación del gel

El porcentaje de acrilamida del gel depende del tamaño de la proteína o proteínas a analizar. Como guía: gel de 10-12 %: 10-30 kDa; gel 8 %: 30-100 kDa; gel de 6 %: >100 kDa. Primero se debe hacer el montaje de los vidrios, después preparar las soluciones de los geles separador y concentrador.

Gel separador (12 %): 8 mL de Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1 (BioRad), 5 mL de Tris 1,5 M pH 8,8, 200 µL SDS 10 %, 6,8 mL H₂O_{mq}, 200 µL Persulfato de Amonio (APS) 10 % y 20 µL TEMED.

Gel concentrador (5 %): 1,7 mL de Acrilamida:Bisacrilamida 37,5:1 (BioRad), 2,5 mL de Tris 0,5 M pH 6,8, 100 µL SDS 10 %, 5,7 mL H₂O_{mq}, 200 µL APS 10 % y 20 µL TEMED.

C. Electroforesis

La electroforesis se realizó en tampón 1x SDS-PAGE²² a un voltaje de 90 V durante 20 min y a 110 V durante el tiempo deseado en una cubeta de electroforesis para proteínas vertical (Bio-Rad Co. Hercules, CA, USA). Como patrón de masa molecular se utilizó una mezcla comercial de proteínas PageRuler Prestainer Protein Ladder Plus (ThermoFisher Scientific Inc.) compuesta por un mix de 9 proteínas recombinantes que va de 10 kDa a 250 kDa.

4.2.15.6. Análisis de Western blot

Transferencia

Primero se preparó el tampón de transferencia 1X (*transfer buffer*) a partir del tampón *Turbo Transfer buffer 5x*. Para dos membranas mini: 75 mL H₂O_{mq}, 25 mL EtOH y 25 mL *buffer 5X*. Después se equilibraron los filtros de papel del tamaño pertinente en tampón de transferencia. Se utilizaron membranas de nitrocelulosa o de PVDF, en este último caso las membranas se activaron en etanol (10 seg) y se

²¹ **SBL5X:** Tris HCl 2 M pH 6,8, SDS, H₂O_{mq}, glicerol, bromofenol, β-mercaptoetanol.

²² **1X SDS-PAGE** = 100 mL SDS-PAGE 10X + 900 mL H₂O_{mq}. SDS-PAGE 10X (1 L) = 30,2 g Tris base, 141,1 g glicina, 100 mL SDS 10 %, H₂O_{mq} hasta 1 L.

equilibraron con el tampón de transferencia. Se colocaron las capas del montaje en el casete en el orden siguiente: (1) casete inferior ánodo (2) filtros de papel inferior (3) membrana de nitrocelulosa o PVDF (4) gel (5) filtros de papel superior (6) casete superior cátodo (figura 8). Antes de poner el filtro de papel superior, se sacaron las burbujas que pudiera haber entre la membrana y el gel. Se cerró el montaje con el casete superior y se seleccionó el protocolo de transferencia deseado. La transferencia del protocolo *mixed* dura aproximadamente unos 10 min.

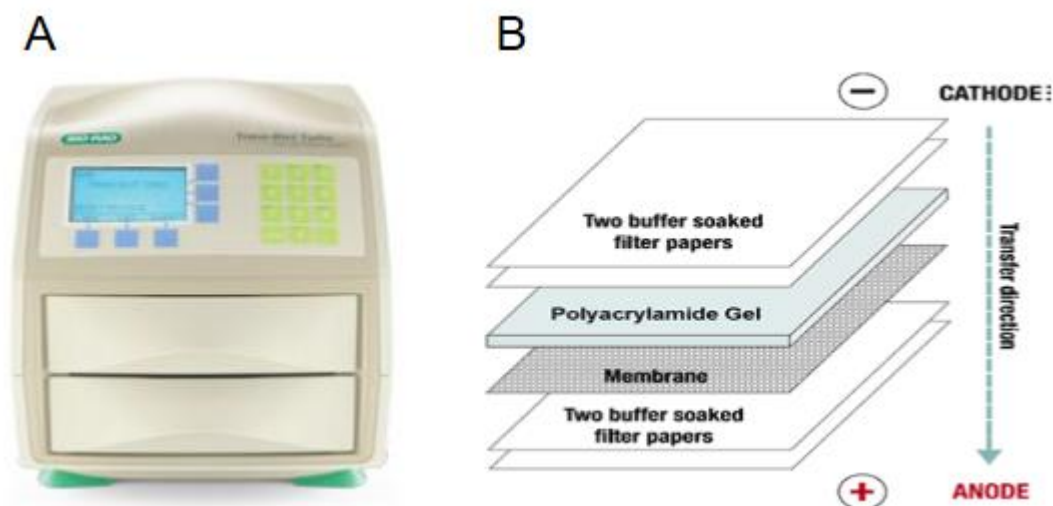


Figura 8. Western Blot. (A) Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad) donde tuvo lugar la transferencia de las proteínas del gel a la membrana. (B) Orden de colocación de los componentes que van en el casete del cátodo al ánodo serían: 2 filtros, gel de poliacrilamida, membrana del Western, 2 filtros.

Tinción Fluorescente Sypro ruby (BioRad)

Para controlar la cantidad de proteína que se carga en cada pocillo, se realiza la tinción *SYPRO RUBY*, que tiñe de forma general todas las proteínas del carril. Esta tinción permite detectar diferencias de concentración con más precisión que la tinción clásica de Coomassie Blue. Además, actualmente se prefiere que los cambios de las proteínas de interés sean normalizados respecto a un control total de la muestra (como la tinción *SYPRO RUBY*), y no respecto a una sola proteína *housekeeping* como la actina. Primero, al sacar la membrana del casete de transferencia, esta fue sumergida en H_2O_{mq} . Después, la membrana fue incubada por 15 minutos en una mezcla de alcoholes (7 % de ácido acético + 10 % de metanol). Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 4 min con H_2O destilada para eliminar el exceso de la mezcla de alcoholes. Tras lo cual, la membrana fue incubada durante 15 min con el reactivo *SYPRO RUBY* y se realizaron 3 lavados de 1 min con H_2O destilada.

A. Visualización de las proteínas

Finalmente, la membrana fue revelada en el aparato *Chemidoc XRS+* con el software de ImageLab. La palanca del aparato debe estar en filtro UV (filtro 1).

B. Blotting con el anticuerpo

Se bloqueó la membrana 1 hora a TA en la solución de bloqueo pertinente.

- Opción 1: Leche 5 % en TBST (proteínas no fosforiladas).
- Opción 2: BSA 5 % en TBST (proteínas fosforiladas o de cantidad escasa).

Seguidamente, se incubó durante toda la noche en solución con el anticuerpo primario 1:1000 en solución de bloqueo. Se realizaron 4 lavados de 4 min con TBST. Se incubó durante 1 hora en solución con el anticuerpo secundario diluido 1:10.000. Tras lo cual se realizaron 4 lavados de 4 min con TBST y un último lavado con TBS1x.

TBS 10X (1L): Tris base 12 g, NaCl 87,7 g. Ajustar pH a 7,4 con HCl. Enrasar con H₂O_{mq} hasta 1 L. TBST, 1X: 100 mL TBS 10X y 0,5 mL Tween 20 y enrasar hasta 1 L.

C. Revelado de membranas

Se usó la cámara ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA) y los protocolos de revelado: “Chemi” y “Colorimetric”. Seguidamente, unimos los reactivos A y B del kit quimioluminiscente ECL (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) y se los añadimos por encima de la membrana cubriéndola toda.

4.2.16. Inmunización en animales con la proteína recombinante rFoxyMT1

La proteína recombinante rFoxyMT1 fue utilizada para la inmunización de los ratones. Los ratones cepa CF1 de 3 semanas fueron obtenidos del estabulario del Instituto de Salud Pública de Chile, ISP. Los animales fueron mantenidos en el estabulario de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Antofagasta hasta su utilización y manejados según protocolos de manipulación de animales previamente aprobados por el Comité de Ética en Investigación Científica (CEIC) de la Universidad de Antofagasta (Protocolo CEIC N° 224/2019). La inmunización de ratones fue realizada inoculando 10 µg de proteína rFoxyMT1 por inmunización (1 dosis cada semana, durante 3 semanas), con una última dosis de refuerzo de 20 µg. Para esto, la proteína recombinante rFoxyMT1 fue resuspendida en 100 µL de buffer fosfato salino (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Los animales fueron inmunizados por inoculación mediante inyección intraperitoneal. Las inmunizaciones tuvieron lugar siempre el mismo día y a la misma

hora. Se usó TiterMax® Gold como adyuvante para todas las inmunizaciones. Posteriormente, los ratones fueron desangrados, sacrificados y los sueros fueron recolectados y almacenados a -20 °C hasta su uso.

4.2.17. Titulación de sueros policlonales

La titulación de los sueros policlonales se realizó mediante Western blot y para ello se realizaron diluciones de los sueros anti-rFoxyMT1, las cuales iban de 1:500 a 1:10.000. Los sueros anti-rFoxyMT1 que contenían el anticuerpo primario del experimento Western Blot fueron resuspendidos en PBS-Tween 20 0,1 %.

4.2.18. Fraccionamiento subcelular

Se realizó el fraccionamiento subcelular de germínulas del wt cultivados durante 12 h en PDB (en presencia o ausencia de metales pesados). Para ello se empleó el método de separación y purificación de fracciones subcelulares mediante ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa descrito (Antebi *et al.*, 1992) con algunas modificaciones.

El proceso requiere la rotura celular, por lo que el micelio se trituró y homogenizó en N₂ líquido hasta conseguir un polvo muy fino y se resuspendió en 1 mL de tampón de permeabilización²³ con 1 mM fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma) y 1 % coctel inhibidor de proteasas (Sigma) (p/v). Tras centrifugar a 4 °C durante 5 min a 1.000g, se desechó el precipitado y el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a 10.000g durante 10 min a 4 °C para obtener la fracción enriquecida en retículo endoplásmico (P10). Esta fracción P10 se resuspendió en 350 µL de tampón de permeabilización con 1 mM PMSF y 1 % coctel inhibidor de proteasas (v/v), y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. El sobrenadante S10 se aplicó sobre una columna con gradiente de sacarosa previamente preparada, depositando alícuotas de 500 µL de tampón de permeabilización con 1 mM PMSF y 1 % coctel inhibidor de proteasas con las concentraciones de sacarosa: 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50 y 54 % (p/v). Las fracciones de sacarosa se depositaron desde la parte inferior a la superior de la columna en orden decreciente de concentración. El gradiente se dejó reposar 12 h a 4 °C antes de su utilización. Una vez depositada la muestra S10 sobre el gradiente, se sometió a centrifugación durante 90 min a 4 °C en un rotor SW50 a 160.000g y se recogieron 14 nuevas fracciones de aproximadamente 350 µL cada una desde la parte superior del gradiente.

²³ **Tampón de permeabilización:** 10 mM HEPES; 1 mM MgCl₂ pH 7,5 ajustado con NaOH.

La concentración de sacarosa de cada fracción se determinó con ayuda de un refractómetro (Atago Co., LTD) y las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

4.2.19. Caracterización fenotípica de mutantes

Con el objetivo de analizar la sensibilidad de estos mutantes frente a diferentes metales pesados, se prepararon stocks de metales pesados, se hicieron crecer las cepas de *F. oxysporum* en PDB y se inocularon las placas de medio sintético de ARNE (SM) que contenían estos metales pesados.

Se prepararon soluciones stock, teniendo en cuenta la solubilidad en agua, la temperatura de almacenaje (en general a temperatura ambiente), y si eran o no fotosensibles (para cubrirlos de la luz). Esta medida de precaución se llevó a cabo para todas las soluciones independientemente de que el metal fuese o no fotosensible.

Tabla 9. Stock metales pesados.

Metal pesado	Concentración	Solubilidad en H₂O
ZnCl ₂	0,1 g/mL	Altamente soluble
CuSO ₄	0,01 g/mL	0,203 g/mL 20 °C
FeSO ₄	0,28 g/mL	0,4 g/mL 20 °C
CdCl ₂	0,01 g/mL	1,4 g/mL (20°C)
AgNO ₃	0,1 g/mL	2,16 g/mL (20 °C)
MnCl ₂	0,1 g/mL	0,757 g/mL a 20 °C
HgCl ₂	0,05 g/mL	0,074 g/mL 20°C

4.2.19.1. Ensayo de crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de metales pesados

Se evaluó el crecimiento de la cepa silvestre, de las mutantes y de las complementadas en presencia de CuSO₄, ZnCl₂ y CdCl₂, entre otros. Para ello, se inocularon suspensiones de 10³, 5x10² y 10² de microconidias en placas de medio SM suplementados con metales pesados a diferentes concentraciones. El objetivo de este ensayo fue evaluar cuál era la MIC (mínima concentración inhibitoria) para cada metal, comparando la cepa silvestre o la complementada con las mutantes y también observar diferencias fenotípicas entre las cepas mencionadas. Para establecer las MICs iniciamos el ensayo partiendo de MICs establecidas para otros hongos patógenos en estudios previos. Las placas que incluían metales pesados se incubaron en estufas a 28 °C durante 7 a 10 días aproximadamente, ocasionalmente cubiertas de la luz.

4.2.19.2. Ensayo de medición de cobre intracelular

La determinación del contenido de Cu intracelular se evaluó en la cepa silvestre y en la mutante en la exportadora de Cu de *F. oxysporum* como previamente se había descrito (Adamo *et al.*, 2012; Brenner *et al.*, 1995). Los microconidios se obtuvieron de cultivos de 3-4 días (28 °C y 170 rpm) y germinaron en PDB (mismas condiciones) por 12h, tras lo cual las germinulas fueron transferidas a un medio líquido SM con o sin 100 μM CuSO_4 e incubadas durante 6 horas (28 °C y 170 rpm). Entonces, los micelios fueron recogidos por filtración y lavados con ddH_2O y con una solución de 10 mM de ácido cítrico en 0,5 % (p/v) NaCl para remover los iones de cobre absorbidos en la superficie celular. El micelio de *F. oxysporum* fue molido con nitrógeno líquido y secado en un horno de laboratorio. Seguidamente, la biomasa seca fue pesada; se usaron 40 mg de biomasa seca para cada ensayo. La biomasa se resuspendió en 300 μL de 20 % (p/v) de ácido tricloroacético (TCA), y se transfirió a un tubo de microcentrífuga con tapón de rosca que contenía 100 μL de perlas de vidrio y se sometió a lisis mecánica mediante 3 ciclos de 20 seg a máxima velocidad con un Fast Prep® - FP120 instrument (Thermo Savant, Holbrook, NY). El extracto crudo se clarificó por centrifugación a 10,000g durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El extracto crudo clarificado se diluyó en 500 μL de agua desionizada y se añadieron 100 μL de 1 % (p/v) de ácido ascórbico y 400 μL del “BCA reagent” [0.006 % (p/v) 2,2'-biquinoline-4,4'-dicarboxylic acid disodium salt hydrate (Sigma), 3,6 % (p/v) NaOH, 15,6 % (p/v) Hepes]. Después de 2 min de incubación a RT, se midió la absorbancia a 354 nm usando UV con un Nanodrop 2000™ spectrophotometer (Thermo Fisher). La cantidad de cobre se refirió como mg Cu g^{-1} de biomasa seca. A 354 nm el coeficiente de atenuación molar es $4,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.2.20. Modelos de infección

Se evaluó la patogenicidad de las cepas mutantes generadas en *F. oxysporum* en un modelo de infección sistémica murino, un modelo de planta y cultivos celulares.

4.2.20.1. Infección de ratones

Para la realización de los estudios *in vivo* de infección sistémica con las cepas de *F. oxysporum* se utilizaron ratones machos OF-1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) de 30 gramos de peso. Todos los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rovira i Virgili. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar con acceso libre a la comida y a la bebida, controlando diariamente el progreso de la infección hasta el último día del experimento. Una vez

finalizado el periodo experimental o cuando los animales mostraron signos de sufrimiento, éstos fueron eutanasiados mediante anoxia por CO₂.

Se usaron ratones OF-1 inmunosuprimidos con una de las siguientes pautas dependiendo del experimento:

- Administración, el día previo a la infección (día -1), de una dosis única de 200 mg/kg de ciclofosfamida (Genoxal® Baxter, Halle/Westfalen, Alemania) intraperitonealmente (i.p.) junto con una dosis de 150 mg/kg de 5-fluorouracilo intravenosamente (Graybill *et al.*, 1998; Ortoneda *et al.*, 2004a).
- Administración i.p. dos días antes de la infección (día -2) de ciclofosfamida (200 mg/kg) (Genoxal® Baxter, Halle/Westfalen, Alemania) y repitiendo la administración de esta dosis cada cinco días hasta el final del experimento (Clemons *et al.*, 2005).

Con ambas inmunosupresiones se consigue reproducir un estado inmunológico de neutropenia con recuentos de neutrófilos < 100/μL (Denning *et al.*, 1995).

Los inóculos utilizados para las infecciones realizadas por *F. oxysporum* se prepararon utilizando solución salina fisiológica estéril. Los inóculos también se ajustaron para conseguir la concentración deseada mediante la cámara de Neubauer y una vez preparado el inóculo, el día 0 se llevó a cabo la infección de los animales mediante la administración intravenosa de 0,2 mL de la suspensión de hongo a través de la vena lateral de la cola. La viabilidad de los inóculos fue comprobada mediante la realización de diluciones seriadas y sembrando en PDA para el recuento de UFC/mL.

A. Estudios de supervivencia

Para evaluar la capacidad virulenta de las cepas mutantes se realizaron estudios de supervivencia mediante los cuales se pudo estudiar si los animales infectados con la cepa mutante tenían una supervivencia significativamente más prolongada que el grupo de animales control (infectados con la cepa wt).

B. Estudios de carga fúngica en órganos

Se realizaron estudios de carga fúngica en órganos diana: pulmón y riñón en el caso de *F. oxysporum*. Los animales correspondientes al grupo de recuperación fúngica se sacrificaron el día 15 después de la infección mediante anoxia por CO₂. Una vez sacrificados, se extrajeron de forma aséptica los órganos diana, se pesaron y se homogenizaron mecánicamente en 1 mL de solución salina estéril. Se realizaron

diluciones seriadas 1:10 de los homogenizados, se sembraron en placas de PDA y finalmente se incubaron a 28 °C para calcular las UFC/g mediante esta fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \times (\text{peso del \acute{o}rgano} + \text{mL utilizados para homogeneizar})^*}{\text{Peso del \acute{o}rgano}}$$

(*) Considerando que 1 g de tejido ocupa un volumen de 1 mL.

4.2.20.2. Infección de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Para analizar el patotipo de los mutantes de *F. oxysporum* obtenidos en este trabajo se inocularon plantas de tomate del cultivar Monika (Syngenta seeds, Almería, España) con suspensiones de esporas de las diferentes cepas (Di Pietro *et al.*, 1998a). Las esporas se recogieron por filtración y posterior centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos, se lavaron muy bien con agua estéril desionizada y se calculó su concentración tras observarlas al microscopio con cámara de Thoma.

Las plantas de tomate se cultivaron en vermiculita hasta que presentaron sus primeras hojas verdaderas (15 días). Tras retirarlas cuidadosamente de la vermiculita se lavaron debajo del grifo suavemente. Seguidamente se sumergieron 10 raíces de plantas durante 30 minutos en una suspensión acuosa con 5×10^6 esporas mL⁻¹, en placas de Petri. A continuación, las plantas se trasplantaron a semilleros individuales con vermiculita y se cultivaron en cámara de cultivo con tubos fluorescente (36 W, fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) a 28 °C.

La evolución de la enfermedad se evaluó durante las semanas siguientes a la infección. Para ello se utilizaron los índices de enfermedad descritos por (Huertas-Gonzalez *et al.*, 1999) que se corresponden con los siguientes estadios: 1, planta sana; 2, primeras hojas afectadas; 3, hojas y peciolo caídos; 4, hojas muertas y tallo erguido; 5, planta muerta. La evolución de la enfermedad también se definió como el porcentaje de supervivencia de las plantas tras 30-40 días usando el método Kaplan-Meier, analizando los datos con el programa GraphPad Prism.

4.2.20.3. Infección en macrófagos

Para evaluar la virulencia de las cepas mutantes de *F. oxysporum* se utilizaron células de macrófagos de ratón (BALB/c) J774.1 las cuales fueron mantenidas como células adherentes en frascos de cultivo celular a 37 °C con 5 % de CO₂ en DMEM (medio esencial mínimo de Eagle) (Biowest) suplementado con L-glutamina con 10 % (p/v) de suero fetal bovino y 1 % de penicilina/estreptomicina.

La lisis celular y la muerte de los macrófagos murinos la causó el crecimiento de las hifas de *F. oxysporum* dentro de los macrófagos (Schafer *et al.*, 2014). Previo a la infección, los macrófagos fueron raspados de la botella de cultivos celulares y transferidos a una placa de cultivo de 6 pocillos con medio DMEM e incubados a

37 °C. 5 % CO₂, durante 20-24 horas. Los microconidios de *F. oxysporum* fueron centrifugados a 14.400g, resuspendidos en DMEM (6 x 10⁵ esporas per mL) y preincubados por 8 h a 37 °C y 120 rpm. Un total de 1,6 x 10⁶ células fueron infectadas con las germínulas de *F. oxysporum* a una MOI 3 (multiplicidad de infección) e incubadas a 37 °C 5 % CO₂ durante 6 h. Entonces, las paredes fueron lavadas dos veces con PBS 1X para eliminar los macrófagos no adherentes y las germínulas no fagocitadas. Consecuentemente, las células fueron lisadas por choque osmótico con agua fría y sembradas en PDA para el conteo celular fúngico viable.

4.2.21. Estadística

Se utilizó el programa Graph Pad Prism versión 6.0 para Windows para elaborar las gráficas de supervivencia y de carga fúngica y para los análisis estadísticos. Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos ≤ 0.05 .

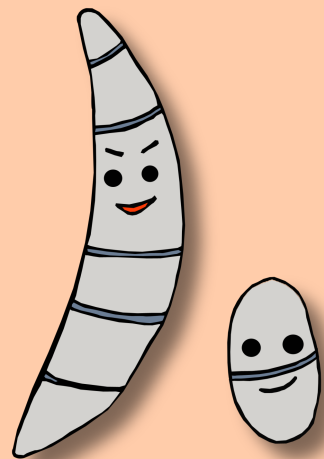
Para realizar los estudios estadísticos, los resultados obtenidos fueron analizados y comparados utilizando los siguientes métodos:

- Método de Kaplan Meier. Este método permite calcular el tiempo medio de supervivencia (TMS) para un grupo de animales o plantas. Tiene en cuenta los animales o plantas que quedan vivos al final del estudio y también que día han muerto los que no sobreviven hasta el final del período de observación. Una vez calculados los TMS para cada grupo, se utiliza el Log-rank test para comparar los TMS de los diferentes grupos entre sí o respecto al grupo control y establecer que grupos son estadísticamente diferentes y cuales se han de considerar iguales.
- Test U de Mann-Whitney. Esta prueba no paramétrica permite comparar los datos obtenidos en los recuentos de colonias por gramo de órgano. No compara las medias, sino que ordena los datos de los dos grupos que se comparan y determina unos rangos. En este test, por lo tanto, no hace falta que los datos sigan una distribución normal y podemos trabajar con los datos originales o con los logaritmos ya que con ambos obtendremos los mismos resultados.
- T-test. Esta prueba evalúa si las medianas de dos grupos son estadísticamente diferentes entre sí. Se ha utilizado para detectar diferencias significativas en los niveles de expresión génica y en las tasas de supervivencia de los macrófagos infectados con *F. oxysporum*. Este análisis es adecuado cuando el tamaño de la muestra es demasiado pequeño. Se utiliza una estimación de la desviación típica en lugar del valor real, hecho que permite utilizar datos originales.

4.2.22. Microscopía

Los análisis de microscopía óptica se llevaron a cabo con germínulas y esporas obtenidas en medio PDB. Para su observación se empleó un objetivo 100 X en un microscopio de campo claro Olympus CH-2 (*Olympus Corporation*, Japón).

5. RESULTADOS



El estudio *in silico* en el genoma de *F. oxysporum* reveló la presencia de una única hipotética metalotioneína (*mt1*, FOXG_02862) y de seis transportadores de Cu, siendo uno de ellos una hipotética ATPasa tipo P (*crpF*, FOXG_03265). En la región promotora de *mt1* destaca la presencia de los elementos de respuesta a metales y en la secuencia codificante motivos de cisteínas altamente conservados. El análisis de la secuencia aminoacídica de CrpF evidenció también la presencia de motivos conservados en exportadoras de Cu, como los motivos de unión a metales o el motivo de translocación del Cu, entre otros.

Ambos mutantes $\Delta mt1$ y $\Delta crpF$ mostraron una mayor sensibilidad a los tres metales testados, Cadmio, Cobre y Zinc. Cabe destacar que el mutante $\Delta crpF$ mostró una extrema sensibilidad al Cu.

Los análisis de expresión revelaron que el Zn activa específicamente a *mt1*, pero la falta de este gen no condujo a una sobreexpresión de los genes *gapdh* y *prx*, asociados con la respuesta al estrés oxidativo. El patrón de expresión de *crpF* mostró una fuerte inducción génica en presencia de Cu.

MT1 se localiza en las fracciones enriquecidas en retículo endoplásmico y en membrana plasmática, así como en las fracciones enriquecidas en el aparato de Golgi y en citosol; según lo determinado por las técnicas de inmunodetección. Los resultados preliminares de la evaluación de las capacidades de unión a metales de MT1, sugieren una alta especificidad hacia los iones metálicos divalentes, especialmente Zn^{2+} . Todos estos resultados sugieren una supuesta función de regulación u homeostática del Zn de esta metaloproteína particular en este organismo.

La falta de *mt1* no alteró la capacidad patogénica del hongo, ni en un modelo vegetal de planta de tomate ni en un modelo murino de infección sistémica. Sin embargo, $\Delta mt1$ mostró una reducción de la resistencia a la fagocitosis de macrófagos murinos, lo que sugiere una conexión entre la ausencia de *mt1* y la capacidad de defensa deteriorada contra el cobre y las especies reactivas de oxígeno. La eliminación de *crpF* no alteró la capacidad patogénica del hongo en un modelo murino de infección sistémica ni su resistencia a la fagocitosis de macrófagos. Sin embargo, las tasas de supervivencia de las plantas de tomate inoculadas con el mutante $\Delta crpF$ fueron significativamente mayores que las plantas inoculadas con el wt o con las cepas complementadas.

5.1. Role of the *Fusarium oxysporum* metallothionein Mt1 in resistance to metal toxicity and virulence

Damaris Lorenzo-Gutiérrez,^a Lucía Gómez-Gil,^b Josep Guarro,^a M. Isabel G. Roncero,^b Ana Fernández-Bravo,^a Javier Capilla^{*a} and Loida López-Fernández^{*a}








^aUnitat de Micologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut and IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; ^bDepartamento de Genetica, Facultad de Ciencias and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3, Universidad de Cordoba, 14071 Cordoba, Spain.

Publicado en: *Metallomics*, 2019, **11**, 1230-1240



Cite this: *Metallomics*, 2019, 11, 1230

Role of the *Fusarium oxysporum* metallothionein Mt1 in resistance to metal toxicity and virulence†

Damaris Lorenzo-Gutiérrez, ^a Lucía Gómez-Gil, ^b Josep Guarro, ^a M. Isabel G. Roncero, ^b Ana Fernández-Bravo, ^a Javier Capilla ^{*a} and Loida López-Fernández ^{*a}

Soil organisms exhibit high tolerance to heavy metals, probably acquired through evolutionary adaptation to contaminated environments. Essentially, metal tolerance in fungi involves several specific and non-specific mechanisms that include metal efflux, metal binding to cell walls, extracellular and intracellular sequestration and complexation with proteins. However, fungi have adopted different strategies to detoxify heavy metals, although species differ in the mechanisms used. In this complex molecular framework, metallothioneins (MTs) are becoming increasingly relevant in metal homeostasis, even though little is known about their role in metal adaptation and virulence in fungal pathogens. With the aim to decipher the function of metallothioneins in the opportunistic fungus *Fusarium oxysporum*, we have carried out an *in silico* analysis that revealed the presence of a hypothetical metallothionein (*mt1*) that has multiple metal responsive elements in its promoter region and conserved cysteine motifs in its coding sequence. Characterization of strain $\Delta mt1$ deficient in the *mt1* gene revealed higher sensitivity of this mutant to copper, cadmium and zinc compared to the wild type strain (wt). Expression analyses revealed that Zn specifically activates *mt1*, but the lack of this gene did not lead to a transcriptional up-regulation of genes *gapdh* and *prx*, associated with the oxidative stress response. The lack of *mt1* did not alter the pathogenic capacity of the fungus, either in tomato plant or in a murine model of systemic infection. Nevertheless, $\Delta mt1$ displayed lower resistance to macrophage killing, suggesting a connection between the absence of *mt1* and impaired defence capacity against copper and reactive oxygen species.

Received 5th April 2019,
Accepted 16th May 2019

DOI: 10.1039/c9mt00081j

rsc.li/metallomics

Significance to metallomics

In the past few years, metallothioneins have become increasingly important, as their wide distribution in eukaryotes and their role in metal homeostasis and detoxification has been discovered. However, few metallothioneins have been deeply characterized in pathogenic fungi so far. In this paper, we identified a novel hypothetical metallothionein in the fungal pathogen *F. oxysporum*. Fungal molecular and physiological responses to heavy metals were evaluated, detecting notable changes in metal tolerance and transcriptional regulation in the strain lacking *mt1*. Our study provides a new insight into metallothioneins and settles the basis for future exploration in other fungi.

Introduction

Some transition metals play essential roles as micronutrients, but they are toxic when they are present above threshold concentrations. Therefore, living cells have adapted to metal excess evolving detoxifying mechanisms such as efflux systems,

sequestration, biosorption and transformation.^{1,2} Adaptation and tolerance to heavy metals are relevant in the environmental and agricultural field, due to the increasing levels of residual metals from chemical pesticides in soil and water.^{3,4} Plants use metals as defence to limit the growth of pathogens, and mammalian macrophages use them to kill microorganisms by increasing Cu and Zn concentrations in the phagosome.^{5–8} Consequently, pathogenic microorganisms have developed metal detoxification strategies. Fungi can adopt a variety of specific and non-specific mechanisms to cope with metal toxicity and, therefore, can exhibit variable tolerance to different metal ions, depending on the presence or activation of such mechanisms.⁹ It has been described that fungi are able to produce chelating proteins,

^a Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut and Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. E-mail: loidalopezfernandez@gmail.com, javier.capilla@urv.cat

^b Departamento de Genética, Facultad de Ciencias and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9mt00081j

metal exporters, vacuoles for ion accumulation or reactive oxygen production as defence.¹⁰ Among them, a key strategy for metal tolerance found in a wide range of eukaryotic organisms is to produce small intracellular chelating peptides that constitute the superfamily of metallothioneins (MTs). It has been shown that these small proteins participate in defence against Cu in some fungi, such as in *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*, although other fungi use preferably copper exporters and production of reactive oxygen intermediates as defence strategies, as in the case of *Aspergillus fumigatus*.⁶ The metal binding capabilities of MTs allow them to act as reservoirs of essential metals, as well as protection against excess of metal ions and free-radical oxidation.^{11–15} Despite the high heterogeneity in the MTs amino acid sequence along living organisms, they all conserve similar structural properties through widespread cysteine motifs that enable them to bind metals forming metal-thiolate clusters.^{16,17}

Here we have addressed a study on *F. oxysporum*, a relevant soil borne fungus characterized by its multi-host pathogenic capacity and multidrug-resistance, which can cause invasive infections in immunocompromised humans and great losses in crops.^{18,19} To investigate the contribution of MTs in the maintenance of metal homeostasis and metal detoxification in this fungus, we have conducted research using genetic and physiological approaches. By *in silico* analyses we have identified a single metallothionein (*mt1*) in the genome of *F. oxysporum*, and through transcriptional analyses we have evaluated its expression in the presence of different heavy metals. A knockout strain for the *mt1* gene was generated and phenotypically characterized, with the purpose of exploring its role in virulence by using animal and plant infection models. In addition, the expression of the metal resistance-related genes *crpF* and *aceA*, and the *prx* and *gapdh* genes of the stress response in wt and mutant strains in the presence of different metal ions was evaluated.

Experimental

Fungal strains and culture conditions

F. oxysporum wild type strain 4287 was used in all experiments. The fungus was stored at -80°C as a microconidial suspension with 30% glycerol. Mycelium for gDNA extraction and conidia were obtained from potato dextrose broth (PDB) cultures with shaking at 170 rpm for 3–4 days as described previously.²⁰ For infection and phenotypical tests fresh conidia were used. For determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of metals, fungal growth was determined in 96-wells plates containing 100 μL of synthetic media (SM) (0.2 g L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g L^{-1} KH_2PO_4 , 0.2 g L^{-1} KCl, 1 g L^{-1} NH_4NO_3 , 0.01 g L^{-1} FeSO_4 , 0.01 g L^{-1} ZnSO_4 , 0.01 g L^{-1} MnSO_4 , 10 g L^{-1} glucose and 15 g L^{-1} agar) supplemented with different concentrations of heavy metals and inoculating fungal spores following the previously reported protocol.²¹ Plates were incubated at 28°C for 7–10 days before being analysed. For colony growth determination, water droplets containing 10^3 , 5×10^2 or 10^2 freshly prepared microconidia were spotted onto SM medium supplemented with CdCl_2 , $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$, ZnCl_2 or CuSO_4 when required. Plates were incubated at 28°C

for 3–15 days before being photographed. For analysis of gene expression, freshly obtained microconidia were germinated in PDB at 28°C and 170 rpm for 12 h, and then transferred to SM medium supplemented with metals when required and incubated for 6 h. After incubation, the mycelium was harvested by filtration, washed with distilled water, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until its use for RNA extraction.

Nucleic acid manipulations

Total RNA and genomic DNA (gDNA) were extracted from *F. oxysporum* ground mycelium in liquid nitrogen with a mortar and pestle according to previously reported protocols.^{22,23} Nucleic acid extractions were resuspended in DNase/RNase-free double distilled water and their quality was determined by running aliquots in RedSafe-stained agarose gels and analysed in a Nanodrop 2000TM spectrophotometer (Thermo Fisher). Southern analyses and probe labelling were carried out as described previously²⁰ using the non-isotopic digoxigenin-labelling kit (Roche, IN, U.S.A.).

In silico analysis, sequence alignments and phylogenetic study

Sequence similarity searches with the BLASTp tool were performed at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and the *F. oxysporum* genome database (<https://genome.jgi.doe.gov/Fusox1/Fusox1.home.html>) to find orthologous proteins. For phylogenetic studies, amino acid sequences were aligned using the CLUSTALW algorithm,²⁴ followed by 1000 nonparametric bootstrap analysis using MEGA v. 6.06 software²⁵ to build the phylogenetic trees.

Genes accession numbers

Gene sequences used in this study can be found in GenBank/EMBL or JGI databases under the following accession numbers: *Neurospora crassa* (*crd2*, NCU05512; *cmt* NCU05561), *F. oxysporum* (*mt1*, FOXG_02862; *crpF*, FOXG_03265; *act1*, FOXG_01569; *gapdh*, FOXG_08006; *prx*, FOXG_15430), *Aspergillus fumigatus* (*cmtA*, AFUA_4G04318), *C. neoformans* (*cmt1*, CNAG_05449; *cmt2*, CNAG_00306), *Candida albicans* (*CRD2*, C4_01160W_A; CUP1, C5_04560C_A), *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1, YHR053C; CRS5, YOR031W) *Exophiala aquamarina* (A1O9_01169), *Capronia coronata* (A1O1_01280), *Exophiala oligosperma* (PV06_10722), *Cladophialophora carrionii* (G647_10338), *Verticillium dahliae* (VDAG_07340), *Madurella mycetomatis* (KXX77160.1), *Thielavia terrestris* (THITE_2110493), *Podospora pauciseta* (formerly *Podospora anserina*) (XP_001905836.1), *Pyricularia oryzae* (formerly *Magnaporthe oryzae*) (MGG_00409), *Phomopsis helianthi* (formerly *Diaporthe helianthi*) (OCW31104.1), *Colletotrichum tofieldiae* (KZL65780.1), *Purpureocillium lilacinum* (XP_018182106.1), *Hirsutella minnesotensis* (HIM_01894), *Drechmeria coniospora* (RJ55_07500), *Claviceps purpurea* (CCE31889.1), *Metarhizium brunneum* (XP_014547345.1), *Trichoderma virens* (TRIVIDRAFT_37717), *Fusarium solani* (formerly *Nectria haematococca*) (XP_003041586.1), *Fusarium graminearum* (FGSG_08172), *Fusarium langsethiae* (KPA37781.1), *Fusarium avenaceum* (FAVG1_04664), *Fusarium fujikuroi* (formerly *F. verticillioides*) (FVEG_01712), *Fusarium proliferatum* (CVK91779.1), *Phialocephala subalpina* (CZR61031.1), *Botrytis cinerea* (BC1G_02248),

Stachybotrys chartarum (S40293 01047), *Cordyceps militaris* (XP 006670488.1), *Torrubiella hemipterigena* (VHEMI00071), *Acremonium chrysogenum* (ACRE 051750), *Penicillium digitatum* (PDIP 15650).

Targeted gene deletion and complementation

Targeted gene replacement of the entire coding region of *mt1* was performed using the split marker technique.²⁶ Briefly, two overlapping constructs were generated by fusion PCR using an Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) for *mt1* gene deletion. The 5' and 3' genomic flanking sequences of *mt1* were obtained by PCR amplification of wt gDNA. The promoter fragment of 981 bp, obtained by amplification with the specific primer pair mt1-9n and mt1-2M13F, was fused to the 3' end of the hygromycin resistance cassette (Hyg^R) (approximately 75%)²⁷ and amplified using primers M13F and hyg-G to generate the first construct (Table 1). The second construct contained the terminator region of *mt1* (1 kb), obtained by amplification with the specific primer pair mt1-3M13R and mt1-11n, fused to the 5' end of the Hyg^R cassette (approximately 75%) amplified using the primer pair M13R and hyg-Y (Table 1). These two overlapping constructs were used to transform protoplasts from the *F. oxysporum* wt strain (Fig. 2A), that were generated using 10% (w/v) of Extralyse (Laffort, Bordeaux, France) for digestion of cell walls.²⁰ The resulting Hyg^R transformants were analysed by PCR and Southern blot to identify homologous recombination events. For complementation of the obtained Δ *mt1* mutant, a 3.5 kb fragment containing the complete *mt1* gene (including promoter and terminator regions) was amplified from gDNA using primers mt1-1 and mt1-4.

The amplified fragment was used to co-transform the protoplast of the Δ *mt1* strain with the 1.4 kb nourseothricin resistance cassette (Nat^R), amplified from plasmid pDNat1²⁸ using primers M13F and M13R. The resulting Nat^R transformants were analysed by Southern blot to confirm integration of *mt1*.

Expression analyses

Total RNA (1 μ g) treated with DNase I (Thermo Fisher) was reverse-transcribed into first-strand complemented DNA (cDNA) with an iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) using a poly-dT antisense primer, according to the manufacturer's instructions. Amplification of *mt1*, *crpF*, *aceA*, *gapdh*, *prx* and the housekeeping *act1*²⁹ was performed from cDNA using specific primers designed on Oligo 7 software (Molecular Biology Insights, Inc., Colorado Springs, CO, USA) (Table 1). Endpoint PCR was performed with (BiotaqTM, Bioline) as follows: 95 °C for 5 min, 30 cycles of 35 s at 94 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C, followed by a final elongation of 7 min at 72 °C. The PCR products were visualized by electrophoresis on 1.5% RedSafe stained agarose gel.

Animal infection assays and fungal burden

Four-week-old male OF1 mice weighing 28–30 g were used (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain). Groups of 8 animals were immunosuppressed by intraperitoneal administration of 200 mg kg⁻¹ of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratories Funk SA, Barcelona, Spain), beginning 2 days prior to the infection and then every 5 days until the end of the experiment. Mice were inoculated intravenously (i.v.) through the lateral tail vein, with a

Table 1 Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence (5' → 3')	Position to ATG	Experimental use
mt1-1	TGAAAATGTGAAGAGACGGG	−1656 (s)	Δ <i>mt1</i> construction, complementation
mt1-2 M13F	<i>gtcgtgactgggaacacctggcg</i> ACTACCTATGACTGAACTTG	−548 (as)	Δ <i>mt1</i> construction, probe
mt1-3 M13R	<i>tcctgtgtgaaattgttatccgt</i> CATTTCCAACATCAGACGAC	+808 (s)	Δ <i>mt1</i> construction
m13F Mt1	<i>ctgatacaagtttcagtcataagtagt</i> CGCCAGGGTTTTCACAGTCACG		Δ <i>mt1</i> construction
m13R Mt1	<i>ttattgtcgtctgatgttgaaatg</i> AGCGGATAACAATTTACACAGGA		Δ <i>mt1</i> construction
mt1-4	AGGTTATCGTTGAGTCGGG	+1878 (as)	Δ <i>mt1</i> construction, complementation
mt1-5	CCCAATGACCACAATCGTAG	−1722 (s)	Δ <i>mt1</i> construction
mt1-9n	ACAAAGACGGCAAACGCAG	−1508 (s)	Δ <i>mt1</i> construction, probe
mt1-10n	ATGAACCTCGCCAAAGAC	+1796 (s)	Δ <i>mt1</i> construction
mt1-11n	AACCCTCGCCAAAGACGTAGA	+1793 (as)	Δ <i>mt1</i> construction
act-9	GCGGTTACACTTTCTCCACCA	+587 (s)	RT-PCR
act-10	TTGAAGGTGGTGACATGGATAC	+818 (as)	RT-PCR
mt1-6	GCCTCCGAAACACCGTCA	+196 (s)	RT-PCR
mt1-7	AAAGCCACCATCAGCAGCC	+403 (as)	RT-PCR
mt1-8	CACAGAAACACAACGCCAC	+337 (as)	RT-PCR
mt1-12	TGCTCATGCGGTCAAAAGTCC	+150 (s)	RT-PCR
mt1-13	CCATCAGCAGCCTTCTCGCA	+396 (as)	RT-PCR
G3PDH-F1	ACCACCGTCCACTCCTACAC	+139 (s)	RT-PCR
G3PDH-R2	GATCTGGTCGTAAAGACACC	+367 (as)	RT-PCR
Peroxi-F1	GCCTTCACCATCCGATCCGT	+438 (s)	RT-PCR
Peroxi-R2	GGCTTGACGATGCGGAATC	+666 (as)	RT-PCR
hyg-G	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA		Hyg ^R cassette
hyg-Y	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA		Hyg ^R cassette
M13F	CGCCAGGGTTTTCACGTCACGAC		Hyg ^R cassette, Nat ^R cassette
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA		Hyg ^R cassette, Nat ^R cassette
M13F2	GCATTCTGGGTAACGACTC		Hyg ^R cassette, PCR verification
M13R2	CGAGACCTAATACAGCCCC		Hyg ^R cassette

Italics and lower case indicate nucleotide sequences added for cloning purposes. Positions are referred to the start codon, (+) downstream or (−) upstream of ATG. Orientation is indicated, (s) sense, (as) antisense.

suspension of 10^7 microconidia per animal in 0.2 mL of sterile saline solution. Virulence was evaluated by survival through 15 days and by fungal load quantification in the kidneys and lungs 7 days after infection.³⁰ After euthanasia by CO₂ anoxia, organs were aseptically removed, weighed and mechanically homogenized in sterile saline solution. Homogenates were serially diluted, placed onto PDA plates, and incubated for 72 h at 28 °C for colony-forming units calculation (CFU g⁻¹ of tissue). Experiments were repeated three times with similar results. Data shown are from one representative experiment.

Plant infection assays

Tomato root infection was performed as described previously.²⁰ Briefly, 2 weeks-old tomato seedlings (cultivar Monika seeds kindly provided by Syngenta, Spain) were inoculated with *F. oxysporum* strains by immersing the roots in 5×10^6 spores mL⁻¹ suspension during 30 min, planted in vermiculite and maintained in a growth chamber. Ten plants were used for each infection group. The severity of disease symptoms and plant survival rate were recorded daily for 30 days as previously described.³¹ Data were plotted using Graph Pad Prism software version 4 for Windows. Experiments were repeated three times with similar results. Data presented are from one representative experiment.

Culturing and infection of mouse macrophages

Adherent macrophage-like cell line J774.1 was maintained in tissue culture flasks at 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Biowest, MO, USA) with L-glutamine supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. For the killing assay we followed the previously reported protocol.³² Prior to infection, macrophages were scraped from the tissue culture flask and transferred to a 6-well culture plate in DMEM and incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂ for 20–24 h. *F. oxysporum* microconidia were centrifuged at 14 400g, resuspended in DMEM (6×10^5 spores per mL) and preincubated for 8 h at 37 °C and 120 rpm. A total of 1.6×10^6 cells were infected with *F. oxysporum* germlings at MOI 1 (multiplicity of infection) and incubated at 37 °C with 5% CO₂ during 6 h. Then, the wells were washed twice with $1 \times$ PBS to remove non adherent macrophages and non-phagocytosed germlings. Subsequently, cells were lysed by cold water osmotic shock and plated onto PDA for fungal viable cell count. Experiments were repeated three times each with duplicate wells per sample.

Statistical analyses

Mean survival times on animal infection were estimated from Kaplan–Meier survival curves and compared among groups using the log rank test. The tissue burden study results were analysed using Mann–Whitney *U* test and the *t* test. Significance of transcriptional levels and survival rates from the macrophage-killing assay were determined using a paired *t* test. All statistical analyses were performed in Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA) for Microsoft Windows. *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant (*).

Results and discussion

The genome of *F. oxysporum* encodes a single putative metallothionein

We conducted an *in silico* analysis of putative genes coding for metallothioneins in the *F. oxysporum* genome database. The results of the protein BLASTp search revealed that *F. oxysporum* contains a single hypothetical MT showed 68.8% identity with *N. crassa* MT (NCU05512). The *F. oxysporum* orthologous sequence corresponds to the predicted copper resistance protein FOXG_02862 (*mt1*), which is annotated as two different translation frames. To verify the length of the gene we examined FOXG_02862 transcripts by cDNA amplification from the wild-type strain (wt) using mt1-12 and mt1-8, which exclusively amplify the short transcript, and mt1-12 and mt1-13, which exclusively amplify the long transcript. The PCR products showed only the longest annotated transcript, indicating no alternative splicing (Fig. S1, ESI†). Alignment of *N. crassa* and *F. oxysporum* *mt1* revealed the presence of conserved cysteine motifs (C–C and C–x–C) that resemble those found in other fungi (Fig. 1A); although the phylogenetic tree constructed revealed high divergence to other well-known fungal MT's (Fig. 1B). From an evolutionary point of view, this sequence heterogeneity might be explained by a large structural variation of MTs associated with functional diversification.¹²

Furthermore, we investigated the genetic diversity of *mt1* and its conservation among other fungi by multiple alignment of orthologous sequences using the clustal W algorithm. The phylogenetic tree constructed brought out high homology within the *Fusarium* genus as well as to other plant pathogens, such as *F. graminearum*, *Claviceps purpurea* or *Pyricularia oryzae* and human opportunistic pathogens such as *Fusarium solani* (Fig. S1C, ESI†). This indicates the widespread nature of Mt1 in species with pathogenic capacity related to *F. oxysporum*.

Additionally, we performed an analysis of the promoter sequence of *mt1*, 1.5 Kb upstream, which revealed the presence of multiple sequence motifs related to metal response. We detected ARE (antioxidant response element), CuSE (copper sensing elements), CuSE* (CuSE-like elements), STRE (stress responsive element) and CDRE (calcineurin-dependent response element) (Fig. S2, ESI†). Previous studies have reported the relevance of these responsive elements in metal homeostasis *via* molecular regulation, as they enable transcriptional responses to metals (Zn and Cd) and oxidative stress molecules.^{33–36} Hence, the presence of such elements in the *mt1* promoter region points to the involvement of this gene in the response to metals and oxidative stress.

Targeted deletion of the *F. oxysporum* *mt1* gene

To determine the role of Mt1 in metal homeostasis and virulence in *F. oxysporum*, we have performed targeted replacement of the *mt1* gene (FOXG_02862) using the Hyg^R cassette as a selective marker. By Southern analyses we detected the 11 kb *Pst* I hybridizing band in the wt strain, that was replaced by a 3 kb fragment in the homologous transformant (Δ *mt1*#126), indicating the disruption of *mt1* (Fig. 2A and B). Complementation of the Δ *mt1* null mutant was confirmed on transformant Δ *mt1*#2, which displayed the original

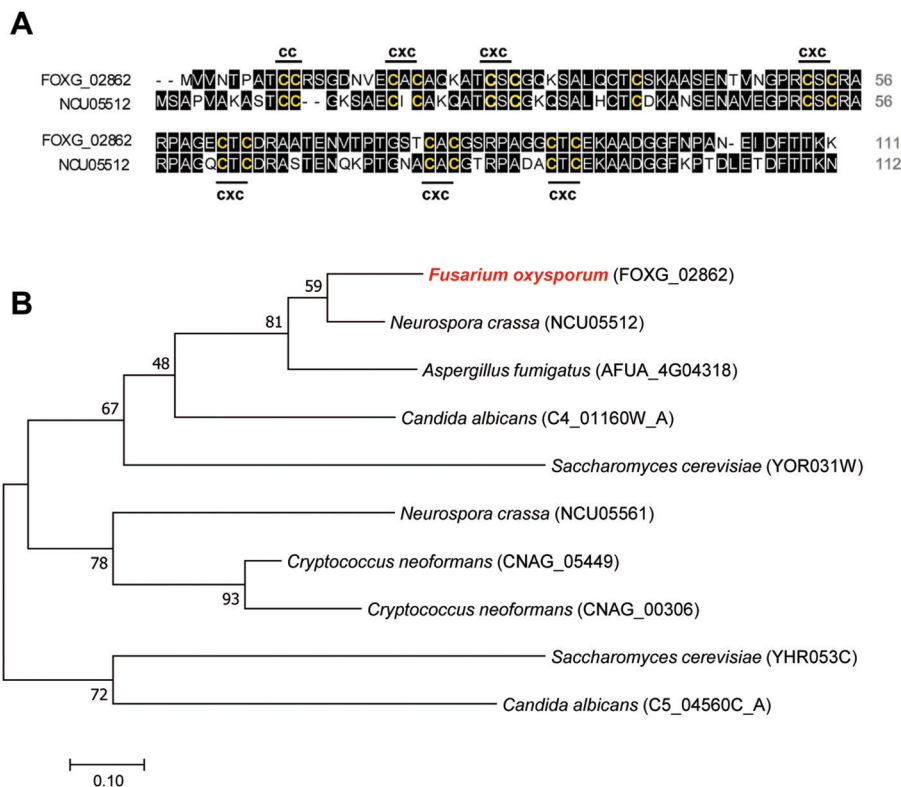


Fig. 1 *F. oxysporum* contains a putative metallothionein in its genome. (A) Alignment of the amino acid sequences of the predicted metallothionein encoded by gene FOXG_02862 and the corresponding ortholog gene *crd2* from *N. crassa*. Identical amino acids are highlighted on a grey background and conserved cysteine motifs (C–C and C–x–C) are highlighted in yellow. (B) Mt1 is highly conserved among the fungi kingdom. Phylogram of predicted fungal Mt1 proteins in *F. oxysporum* and closer fungal species constructed using the Neighbour-Joining method. Bootstrap values obtained from 1000 replicates are indicated at nodes. Scale bar indicates the relative length of each branch. Clustal W was used for protein alignment.

3 kb *Pst* I hybridizing band plus an additional band, indicating ectopic insertion of the gene (Fig. 2B). Additionally we performed specific PCRs to confirm deletion and complementation events. Fig. 2C shows the result of a positive PCR on knockout and complemented strains using primers mt1-9n and M13R2, localized in the promoter of the *mt1* and Hyg^R cassette, respectively. PCR was positive for the wt and complemented strain and negative for Δ mt1, using primers mt1-6 and mt1-7 localized in *mt1* (Fig. 2D).

***mt1* is induced by Zn and its lack does not activate the transcription of selected genes involved in metal homeostasis or oxidative stress**

To investigate whether *mt1* is constitutively expressed or induced by metal ions, we determined the expression profile of *mt1* grown in the presence of different heavy metals. Increased *mt1*-transcript levels were detected in the wt strain in the presence of Zn ($p = 0.023$), but not in Cd or Cu ($p > 0.48$). As expected, *mt1* was not transcribed in the Δ mt1 mutant (Fig. 3). To gain a better insight into metal response, we analyzed other key genes involved in metal homeostasis and stress response in fungi. The expression of *crpF* (coding for copper transporter ATPase), *aceA* (coding for transcription factor), *prx* (coding for peroxiredoxin with anti-oxidative activity) and *gapdh* (coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase known to act as oxidative sensor) was determined.^{6,37} Under control and metal conditions, wt and

mutant strains displayed similar transcript levels of *aceA*, therefore none of the metals assayed were able to increase its expression. In contrast, the hypothetical copper transporter *crpF* was significantly upregulated under Cu presence in the wt strain ($p = 0.0015$). Regarding stress response, upregulation of *gapdh* under Zn exposure ($p = 0.044$) but not in the presence of other metals was detected in the wt strain. In general, Δ mt1 showed slightly higher transcript levels of *gapdh* than wt under all conditions and especially when exposed to Cd or Zn, although with no statistical significance was observed ($p > 0.21$). The expression of the anti-oxidant gene *prx* in the wt strain was similar under all conditions, with the exception of Zn that was upregulated ($p = 0.006$), while Δ mt1 showed lower expression levels than wt in control conditions ($p = 0.006$) and in the presence of Cd ($p = 0.0002$) and Cu ($p = 0.036$). These results suggest that heavy metals did not induce *prx* in Δ mt1 despite its higher susceptibility to metals, its expression being similar under all tested conditions. All together this indicates that excess of metals does not trigger higher oxidative stress due to the absence of *mt1*, as the glycolytic enzyme Gapdh participates in the stress signaling pathway and Prx is an antioxidant enzyme.^{37–39}

Differences in the transcriptional response of *F. oxysporum* to the presence of the metals assayed were detected, with Zn being the metal that most activates the expression of *mt1*. It should be considered that organisms require tight control of

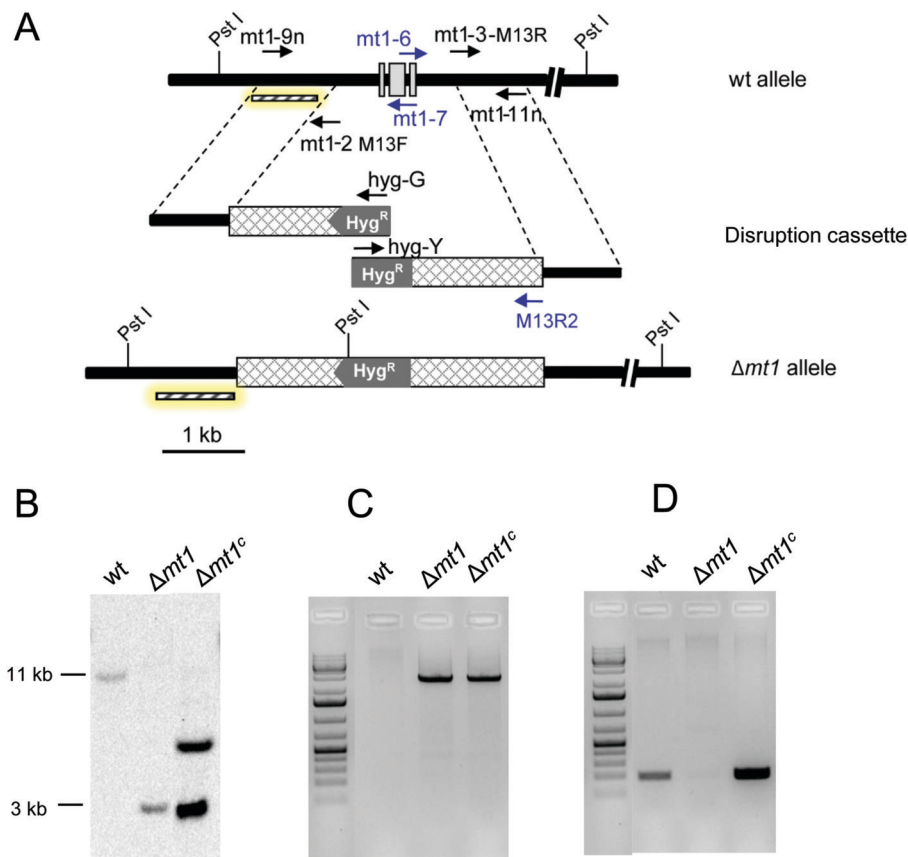


Fig. 2 Targeted disruption of the *F. oxysporum* *mt1* gene. (A) Target gene replacement strategy using a disruption construct obtained by fusion PCR with the Hyg^R cassette as a selective marker. Relative positions of primers used for PCR and the probe (dashed bars) are indicated. (B) Southern blot analysis of gDNA from wt strain and transformants. gDNAs were digested with *Pst* I to detect deletion and complementation of *mt1*. (C) PCR amplification of gDNA of the wt strain and transformant Δ *mt1*#126 to confirm deletion of *mt1* using primers *mt1*-9n and M13R2 (positive for Δ *mt1*#126 and complemented strains) and (D) primers *mt1*-6 and *mt1*-7 (positive for wt and complemented strains).

metal levels. Therefore cellular response to excess metals is aimed at preventing rival cations from replacing native cofactors.⁴⁰ However, metal ions differ in their binding promiscuity, so some of them have a greater ability to substitute native cofactors being highly competitive. For instance, Zn can easily replace other metals causing inactivation of intracellular metalloproteins and consequently leading to cell damage, even if it is a redox-inactive metal.¹⁰ As other authors pointed out, cells may have evolved metal-specific sensors, transcription factors and chelators, such as metallothioneins, to ensure the correct binding metal.^{41,42} Our results give evidence that *F. oxysporum* *mt1* is a Zn-regulated gene, and its absence moderately reduces metal tolerance, which may indicate that other mechanisms involved in metal detoxification are involved. There are a few studies that analyzed metal activation of MTs in other fungal organisms, initially focused on evaluating their expression in the presence of Cu.^{33,43} More recently metal-specific regulation of MTs has also been reported in some fungi. Thus, divalent metal ions, including Zn, or monovalent metals respectively activate specific MTs.^{44,45} However, in our case only Zn from the metals tested was able to activate *mt1*. Our results are in agreement with other studies in humans, where the activation of MTs in the presence of excess metals has been demonstrated. Particularly in Wilson's disease, a genetic disorder based on a

mutation in the copper exporter *ATP7B*, patients are treated with zinc acetate, which induces the expression of intestinal metallothioneins that bind copper preventing their absorption and transportation into the liver.⁴⁶

Faced with an increase in toxic metals, activation of genes involved in metal homeostasis, such as the transcription factor *aceA* and the copper transporter *crpF*, would also be expected due to their role as mediators of metal detoxification.⁴⁷ However, we only detected upregulation of *crpF* in the presence of Cu. No genetic compensation was detected by the loss of *mt1*, since transcriptional modulation of the genes evaluated was similar between the wt and mutant strain.

Δ *mt1* mutants have reduced tolerance to copper, cadmium and zinc

Several protective mechanisms involved in metal detoxification have been reported in fungi, such as metal exporter proteins, cell wall thickness or intracellular and extracellular chelators.⁴⁸ With the aim of deciphering the contribution and specificity of *Mt1* in metal tolerance, we have assessed the sensitivity of wt, Δ *mt1* and complemented strain Δ *mt1*^c to growing concentrations of Cd, Cu and Zn by MIC, and radial growth assays. Δ *mt1* showed lower MIC to CdCl₂, Zn(O₂CCH₃)₂ and ZnCl₂ compared to wt

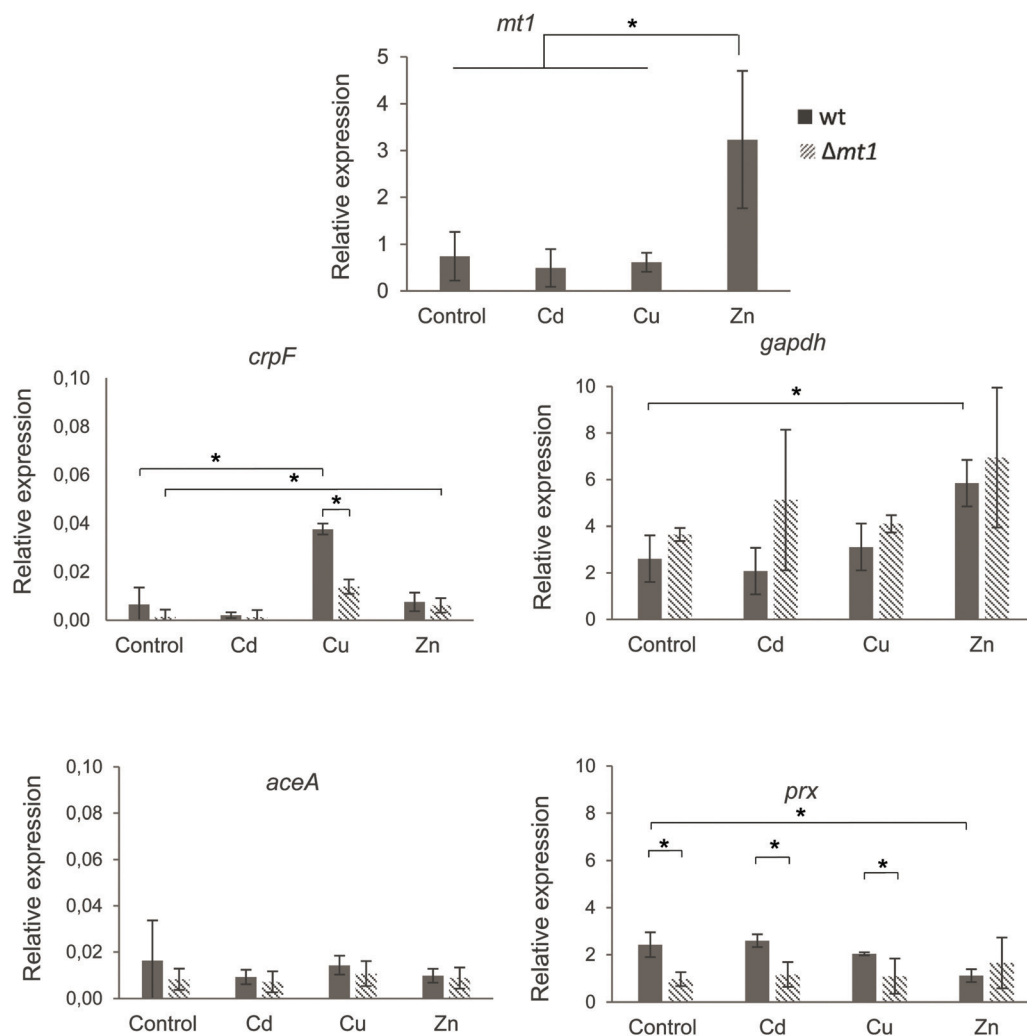


Fig. 3 Transcriptional analyses of *mt1* and other metal homeostasis and stress related genes by RT-PCR analysis. Transcript levels of *act*, *mt1*, *crpF*, *aceA*, *prx* and *gapdh* from *wt* and $\Delta mt1$ strains on control condition and under exposure to 0.1 mM CdCl_2 , 0.175 mM CuSO_4 or 7.5 mM ZnCl_2 are shown.

(Fig. S3, ESI[†]). As shown in Fig. 4, $\Delta mt1$ exhibited reduced radial growth in comparison to the *wt* in the presence of 0.15 mM CdCl_2 , 1.3 mM CuSO_4 and 20 mM $\text{ZnCl}_2/\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$, demonstrating the role of *Mt1* in the resistance to those heavy metals. Interestingly, mycelia cultured under Cd exposure showed colour changes, acquiring orange tones. Some authors have reported the

production of orange-brown pigments in fungal colonies, probably due to the induction of pigments that contribute to metal biosorption of Cd onto the cell walls.^{49,50} In the case of 20 mM ZnCl_2 and 20 mM $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$, growth inhibition was also observed in the mutant, although in a more subtle way. However, the mycelia became thicker in the presence of ZnCl_2 compared to

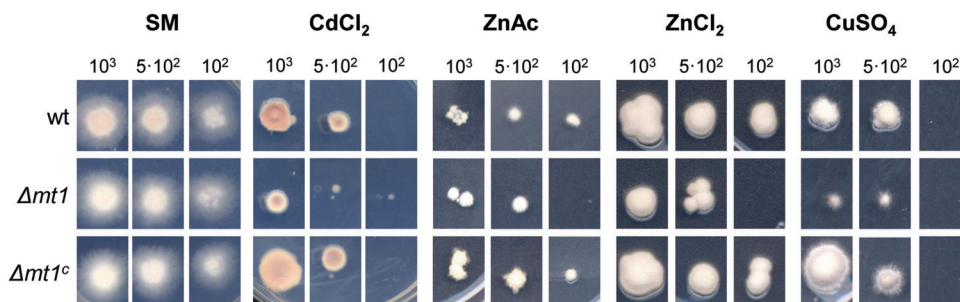


Fig. 4 Loss of *mt1* impairs growth of *F. oxysporum* under cadmium, copper and zinc exposure. Fungal colonies from the *wt*, $\Delta mt1$ and complemented $\Delta mt1^c$ strains grown for 6–7 days at 28 °C on SM plates containing 0.15 mM cadmium (CdCl_2), 1.3 mM copper (CuSO_4) or 20 mM zinc ($\text{ZnCl}_2/\text{ZnAc}$). The number of inoculated spores is indicated. Zinc acetate $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$ is indicated as ZnAc.

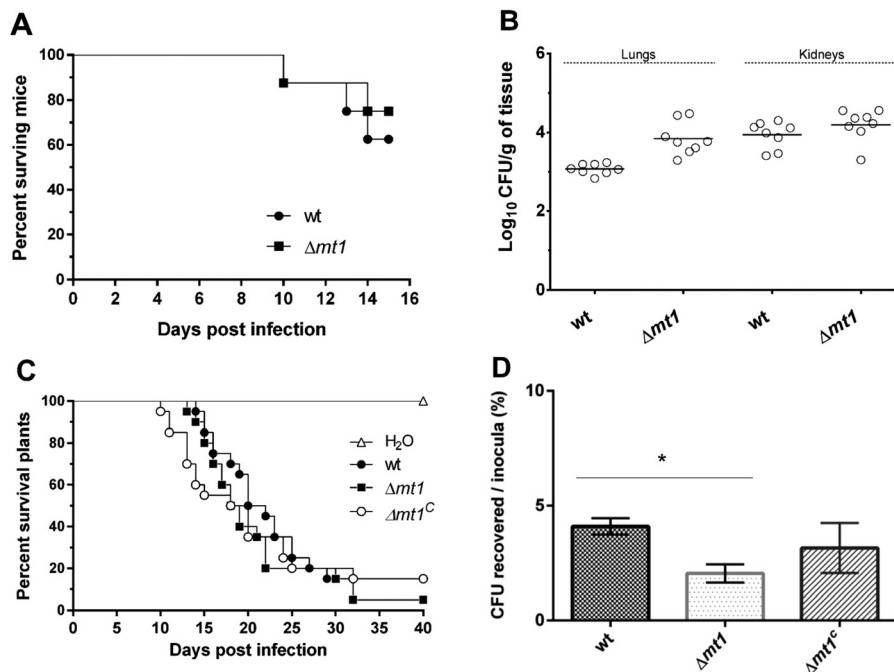


Fig. 5 MT1 is not essential for virulence of *F. oxysporum*. (A) Virulence of *F. oxysporum* strains in the immunosuppressed murine model host inoculated with 10^7 microconidia of the indicated strains by lateral tail vein injection. Percentage survival values were plotted for 15 days. (B) Fungal load quantification of the lungs and kidneys from eight randomly chosen surviving mice from each strain at day 7 after infection using a CFU estimation method. (C) Survival of groups of 10 tomato plants inoculated by immersing the roots into a suspension of 5×10^6 freshly obtained microconidia mL^{-1} of the indicated strains. Experiments were performed at least three times with similar results and the percentage survival values were plotted for 40 days from one representative experiment. (D) Percentage of viable hyphae recovered after 6 h of co-cultivation with macrophages. Infected cell monolayers were lysed and assayed for the presence of viable fungal hyphae by CFU count. Data are means of results from duplicated samples from three independent experiments.

the control and instead seemed to undergo shrinkage by $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$ addition. This phenomenon of mycelial thickening has also been described in other filamentous fungi.⁵¹ As expected, reintroduction of the wt allele completely restored the resistance to the heavy metals tested.

Based on these results, we suggest that Mt1 is not a copper-specific protein, but presumably is involved in Cd, Cu and Zn detoxification and thus, loss of *mt1* impaired homeostasis of these metals in *F. oxysporum*. Indeed, these proteins have typically been described as having different metal binding preferences.^{52,53} Overall, our results provide evidence of an involvement of *mt1* in metal tolerance, although other mechanisms may be participating.

***mt1* is dispensable for virulence in both mice and plant hosts but contributes to resistance to macrophage killing**

We have evaluated the contribution of *mt1* to the pathogenicity of *F. oxysporum* in both plant and animal models of infection.⁵⁴ Mortality rates of immunosuppressed mice infected with wt and $\Delta mt1$ microconidia resulted in 37.5% and 25% respectively, after challenge with 1×10^7 CFU per animal ($p = 0.72$) (Fig. 5A). No differences in mortality rates among strains were observed when infected with higher inoculum 2×10^7 CFU per animal (data not shown). Likewise, no significant differences in fungal burden were detected within wt and $\Delta mt1$ ($p > 0.05$) (Fig. 5B) high fungal loads.

Similarly, tomato infection with wt and $\Delta mt1$ strains caused comparable vascular wilt symptoms and mortality rates ($p = 0.29$) (Fig. 5C). Hence, deletion of *mt1* does not affect fungal survival nor virulence in both assayed models. Similarly, deletion of the metallothionein *cmtA* in *Aspergillus fumigatus* did not result in virulence attenuation in mice, while its lack strongly reduced the pathogenicity of *Magnaporthe grisea* and *C. neoformans* in rice plant and murine infection models, respectively.^{6,43,55} Quantification of phagocytized surviving conidia after 6 h of infection showed a reduced viability of $\Delta mt1$ in comparison to wt ($p = 0.003$) (Fig. 5D). The reduced ability of the mutant to survive within macrophages might be related to impaired resistance to reactive oxygen species (ROS) and metal ions, which exert killing functions inside the phagolysosome.⁶ In particular, Cu and Zn accumulation seems to be a critical component of the antimicrobial repertoire of macrophages and, therefore, proteins involved in metal homeostasis as MTs could participate in fungal defence.⁸

Conclusions

We have detected a single metallothionein in the *F. oxysporum* genome that shows longer amino acid sequence than the classical short MTs found in most fungi, whilst retaining the common cysteine-rich domains. Moreover, the identification of metal regulatory elements located in the upstream region of *mt1* reinforces the hypothesis of its involvement in heavy metal homeostasis.

The present study provides the first evidence that *F. oxysporum* Mt1 increases tolerance to Cd, Cu and Zn. The fact that *mt1* is not transcriptionally regulated by Cd or Cu, but by Zn reveals unexpected specific regulation. Thus, Mt1 plays an important role in Zn homeostasis, a major cellular regulatory ion that undergoes a tight regulation in eukaryotic cells.⁵⁶

In addition, the $\Delta mt1$ response to heavy metal stress did not lead to enhanced transcription of *gapdh* and *prx*, both usually activated under cellular oxidative stress. This seems to indicate that $\Delta mt1$ apparently does not undergo oxidative stress in the presence of metals, possibly due to the activation of other mechanisms that would be contributing to metal tolerance.

Regarding pathogenicity, we observed that *mt1* does contribute to resistance to macrophage-mediated killing, since its deficiency reduces fungal survival within the phagosome. Nevertheless, *mt1* has no evident contribution to virulence in mouse and tomato plant hosts, as reported in other fungi. Unfortunately, there are still few reports describing the role of metallothioneins in fungal pathogenesis. For instance, deletion of *mt1* in a pathogenic strain of *M. grisea* decreases its virulence by reducing the ability of the pathogen to penetrate rice leaves.⁴³ Similarly, the absence of *mt1* in *C. neoformans* diminishes its pathogenicity in mice,^{43,55} while no effect on *A. fumigatus* was found.⁶ The expression analyses revealed a specific induction of *mt1* by Zn and not by Cd or Cu in *F. oxysporum*. We conclude that these differences may stem from the fact that not all organisms fight against toxic metals using the same molecular armamentarium. Therefore, *F. oxysporum* likely harbours other unrecognized genes for metal response and homeostasis, the discovery of which will contribute to a better understanding of this pathogenic fungus.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Prof. Silvia Atrián for her inspiring work and for introducing us into the fungal metallothioneins world and the staff in the Microbiology Unit of the University Rovira i Virgili (URV), Carme Sanmartí and Nuria Pilas, for their technical assistance.

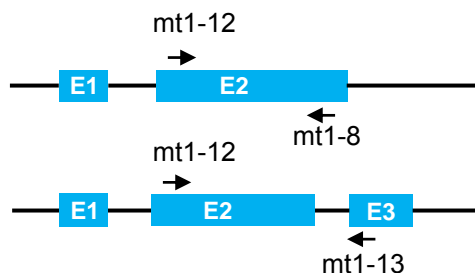
References

- 1 J. L. Hall, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *J. Exp. Bot.*, 2002, **53**, 1–11.
- 2 S. Zafar, F. Aqil and I. Ahmad, Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil, *Bioresour. Technol.*, 2007, **98**, 2557–2561.
- 3 O. B. Ojuederie and O. O. Babalola, Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2017, **14**, 1504.
- 4 S. R. Tariq, M. Shafiq and G. A. Chotana, Distribution of heavy metals in the soils associated with the commonly used pesticides in cotton fields, *Scientifica*, 2016, 7575239.
- 5 A. C. Horger, H. N. Fones and G. M. Preston, The current status of the elemental defense hypothesis in relation to pathogens, *Front. Plant Sci.*, 2013, **4**, 395.
- 6 P. Wiemann, A. Perevitsky, F. Y. Lim, Y. Shadkchan, B. P. Knox, J. A. Landero Figueora, T. Choera, M. Niu, A. J. Steinberger, M. Wuthrich, R. A. Idol, B. S. Klein, M. C. Dinuer, A. Huttenlocher, N. Osherov and N. P. Keller, *Aspergillus fumigatus* copper export machinery and reactive oxygen intermediate defense counter host copper-mediated oxidative antimicrobial offense, *Cell Rep.*, 2017, **19**, 2174–2176.
- 7 S. Garcia-Santamarina and D. J. Thiele, Copper at the fungal pathogen-host axis, *J. Biol. Chem.*, 2015, **290**, 18945–18953.
- 8 S. L. Stafford, N. J. Bokil, M. E. Achard, R. Kapetanovic, M. A. Schembri, A. G. McEwan and M. J. Sweet, Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper, *Biosci. Rep.*, 2013, **33**, 541–554.
- 9 O. G. Oladipo, O. O. Awotoye, A. Olayinka, C. C. Bezuidenhout and M. S. Maboeta, Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites, *Braz. J. Microbiol.*, 2018, **49**, 29–37.
- 10 F. Gerwien, V. Skrahina, L. Kasper, B. Hube and S. Brunke, Metals in fungal virulence, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2018, **42**, DOI: 10.1093/femsre/fux050.
- 11 D. Egli, J. Domenech, A. Selvaraj, K. Balamurugan, H. Hua, M. Capdevila, O. Georgiev, W. Schaffner and S. Atrian, The four members of the Drosophila metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification, *Genes Cells*, 2006, **11**, 647–658.
- 12 M. Capdevila and S. Atrian, Metallothionein protein evolution: a miniassay, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**, 977–989.
- 13 N. Chiaverini and M. De Ley, Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage, *Free Radical Res.*, 2010, **44**, 605–613.
- 14 M. van Lookeren Campagne, H. Thibodeaux, N. van Bruggen, B. Cairns, R. Gerlai, J. T. Palmer, S. P. Williams and D. G. Lowe, Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 12870–12875.
- 15 K. Degtyarenko, Bioinorganic motifs: towards functional classification of metalloproteins, *Bioinformatics*, 2000, **16**, 851–864.
- 16 B. Ruttkay-Nedecky, L. Nejdil, J. Gumulec, O. Zitka, M. Masarik, T. Eckschlager, M. Stiborova, V. Adam and R. Kizek, The role of metallothionein in oxidative stress, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 6044–6066.
- 17 J. Calvo, H. Jung and G. Meloni, Copper metallothioneins, *IUBMB Life*, 2017, **69**, 236–245.
- 18 J. Guarro and J. Gene, Opportunistic fusarial infections in humans, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1995, **14**, 741–754.
- 19 A. M. Al-Hatmi, J. F. Meis and G. S. de Hoog, *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance, *PLoS Pathog.*, 2016, **12**, e1005464.

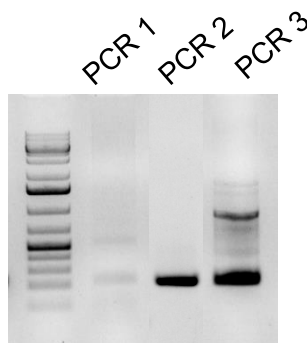
- 20 A. Di Pietro and M. I. Roncero, Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1998, **11**, 91–98.
- 21 D. Canovas, L. Studt, A. T. Marcos and J. Strauss, High-throughput format for the phenotyping of fungi on solid substrates, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 4289.
- 22 S. M. Aljanabi and I. Martinez, Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 4692–4693.
- 23 P. Chomczynski, A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples, *Biotechniques*, 1993, **15**(532–534), 536–537.
- 24 J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**, 4673–4680.
- 25 K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.*, 2013, **30**, 2725–2729.
- 26 N. L. Catlett, B. N. Lee, O. C. Poder and G. Turgeon, Split-Marker Recombination for Efficient Targeted Deletion of Fungal Genes, *Fungal Genet. Biol.*, 2003, **50**, 9–11.
- 27 A. M. Carroll, J. A. Sweigard and B. Valent, Improved vectors for selecting resistance to hygromycin, *Fungal Genet. Newsl.*, 1993, **41**, 22.
- 28 B. Hoff, J. Kamerewerd, C. Sigl, I. Zadra and U. Kuck, Homologous recombination in the antibiotic producer *Penicillium chrysogenum*: strain DeltaPcku70 shows up-regulation of genes from the HOG pathway, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 1081–1094.
- 29 M. S. Lopez-Berges, N. Rispail, R. C. Prados-Rosales and A. Di Pietro, A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB, *Plant Cell*, 2010, **22**, 2459–2475.
- 30 R. C. Prados-Rosales, R. Roldán-Rodríguez, C. Serena, M. S. Lopez-Berges, J. Guarro, A. Martínez-del-Pozo and A. Di Pietro, A PR-1-like Protein of *Fusarium oxysporum* Functions in Virulence on Mammalian Hosts, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 21970–21979.
- 31 M. S. Lopez-Berges, J. Capilla, D. Turra, L. Schafferer, S. Matthijs, C. Jochl, P. Cornelis, J. Guarro, H. Haas and A. Di Pietro, HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*, *Plant Cell*, 2012, **24**, 3805–3822.
- 32 K. Schafer, J. M. Bain, A. Di Pietro, N. A. Gow and L. P. Erwig, Hyphal growth of phagocytosed *Fusarium oxysporum* causes cell lysis and death of murine macrophages, *PLoS One*, 2014, **9**, e101999.
- 33 K. S. Kumar, S. Dayananda and C. Subramanyam, Copper alone, but not oxidative stress, induces copper-metallothionein gene in *Neurospora crassa*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **242**, 45–50.
- 34 G. W. Stuart, P. F. Searle, H. Y. Chen, R. L. Brinster and R. D. Palmiter, A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1984, **81**, 7318–7322.
- 35 G. W. Stuart, P. F. Searle and R. D. Palmiter, Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences, *Nature*, 1985, **317**, 828–831.
- 36 G. K. Andrews, Regulation of metallothionein gene expression, *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1990, **14**, 193–258.
- 37 G. M. Adamo, S. Brocca, S. Passolunghi, B. Salvato and M. Lotti, Laboratory evolution of copper tolerant yeast strains, *Microb. Cell Fact.*, 2012, **11**, 1.
- 38 S. Morigasaki, K. Shimada, A. Ikner, M. Yanagida and K. Shiozaki, Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade, *Mol. Cell*, 2008, **30**, 108–113.
- 39 P. Xu, G. Zeng, D. Huang, H. Dong, C. Lai, M. Chen, W. Tang, F. Li, Y. Leng, M. Cheng, X. He and Y. He, Cadmium induced hydrogen peroxide accumulation and responses of enzymatic antioxidants in *Phanerochaete chrysosporium*, *Ecol. Eng.*, 2015, **75**, 110–115.
- 40 T. Dudev and C. Lim, Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 538–556.
- 41 J. C. Rutherford and A. J. Bird, Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells, *Eukaryotic Cell*, 2004, **3**, 1–13.
- 42 K. J. Waldron and N. J. Robinson, How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?, *Nat. Rev.*, 2009, **7**, 25–35.
- 43 S. L. Tucker, C. R. Thornton, K. Tasker, C. Jacob, G. Giles, M. Egan and N. J. Talbot, A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*, *Plant Cell*, 2004, **16**, 1575–1588.
- 44 K. Hlozkova, M. Matenova, P. Zackova, H. Strnad, H. Hrselova, M. Hroudova and P. Kotrba, Characterization of three distinct metallothionein genes of the Ag-hyperaccumulating ectomycorrhizal fungus *Amanita strobiliformis*, *Fungal Biol.*, 2016, **120**, 358–369.
- 45 J. Sacký, T. Leonhardt, J. Borovicka, M. Gryndler, A. Briksi and P. Kotrba, Intracellular sequestration of zinc, cadmium and silver in *Hebeloma mesophaeum* and characterization of its metallothionein genes, *Fungal Genet. Biol.*, 2014, **67**, 3–14.
- 46 Q. Y. Dong and Z. Y. Wu, Advance in the pathogenesis and treatment of Wilson disease, *Transl. Neurodegener.*, 2012, **1**, 23.
- 47 Z. Cai, W. Du, Z. Zhang, L. Guan, Q. Zeng, Y. Chai, C. Dai and L. Lu, The *Aspergillus fumigatus* transcription factor AceA is involved not only in Cu but also in Zn detoxification through regulating transporters CrpA and ZrcA, *Cell. Microbiol.*, 2018, **20**, e12864.
- 48 M. Bellion, M. Courbot, C. Jacob, D. Blaudez and M. Chalot, Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, **254**, 173–181.

- 49 M. Mohammadian Fazli, N. Soleimani, M. Mehrasbi, S. Darabian, J. Mohammadi and A. Ramazani, Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential, *J. Environ. Health Sci. Eng.*, 2015, **13**, 19.
- 50 A. Jarosz-Wilkolazka, M. Graz, B. Braha, S. Menge, D. Schlosser and G. J. Krauss, Species-specific Cd-stress response in the white rot basidiomycetes *Abortiporus biennis* and *Cerrena unicolor*, *Biomaterials*, 2006, **19**, 39–49.
- 51 L. Ezzouhri, E. Castro, M. Moya, F. Espinola and K. Lairini, Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2009, **3**, 035–048.
- 52 A. W. Foster and N. J. Robinson, Promiscuity and preferences of metallothioneins: the cell rules, *BMC Biol.*, 2011, **9**, 25.
- 53 M. Capdevila, O. Palacios and S. Atrian, The zn- or cu-thionein character of a metallothionein determines its metal load when synthesized in physiological (metal-unsupplemented) conditions, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2010, 541829.
- 54 M. Ortoneda, J. Guarro, M. P. Madrid, Z. Caracul, M. I. Roncero and E. Mayayo, and A. Di Pietro, *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals, *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 1760–1766.
- 55 C. Ding, R. A. Festa, Y. L. Chen, A. Espart, O. Palacios, J. Espin, M. Capdevila, S. Atrian, J. Heitman and D. J. Thiele, *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence, *Cell Host Microbe*, 2013, **13**, 265–276.
- 56 W. Maret, Zinc in Cellular Regulation: The Nature and Significance of “Zinc Signals”, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**, 2285.

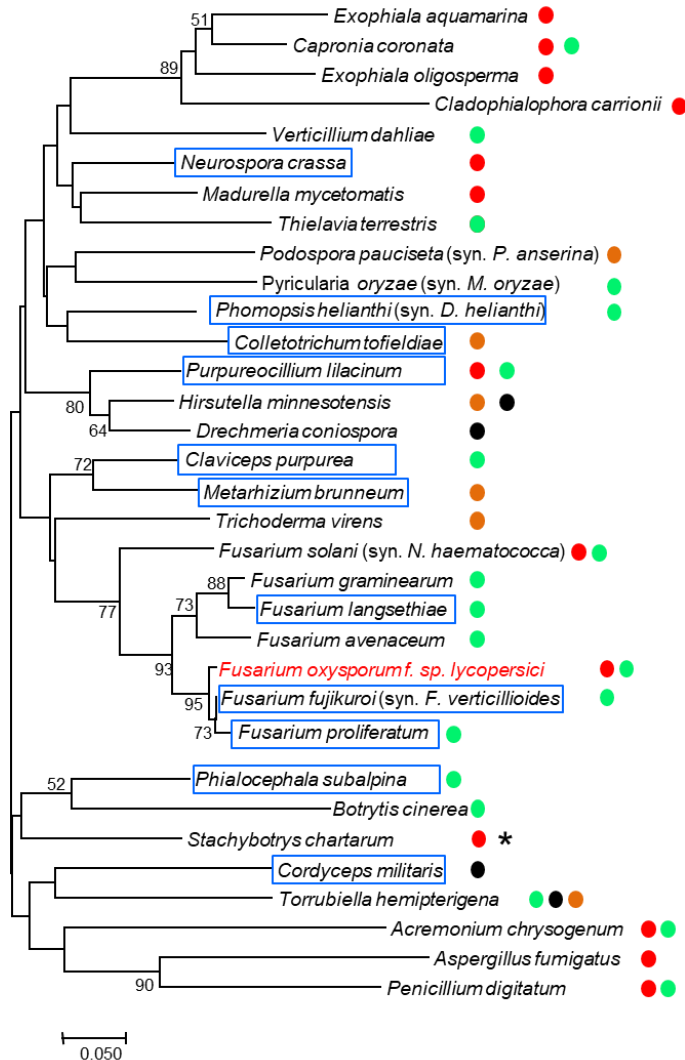
A



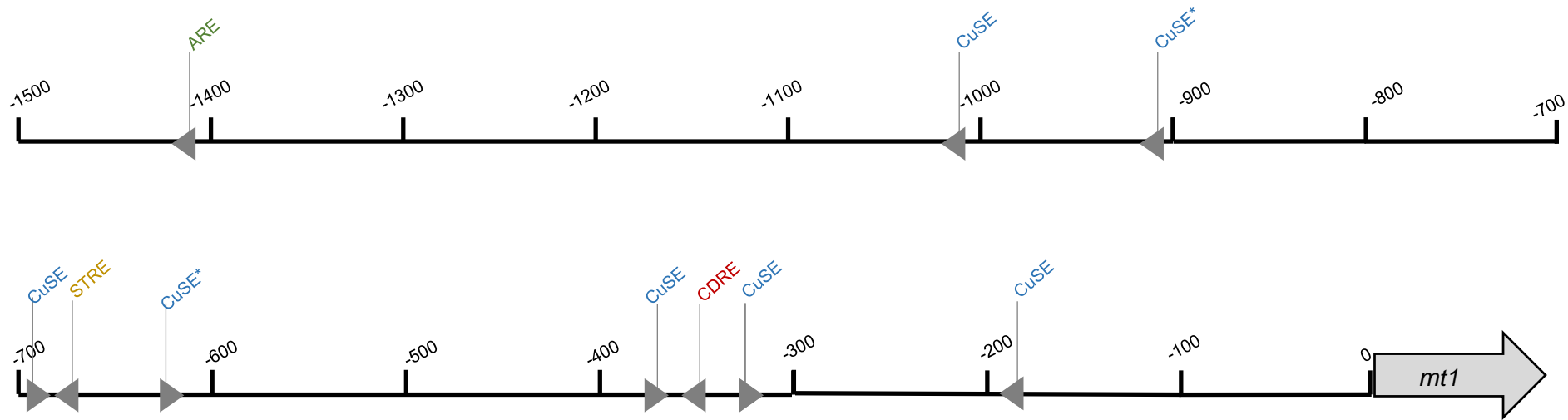
B



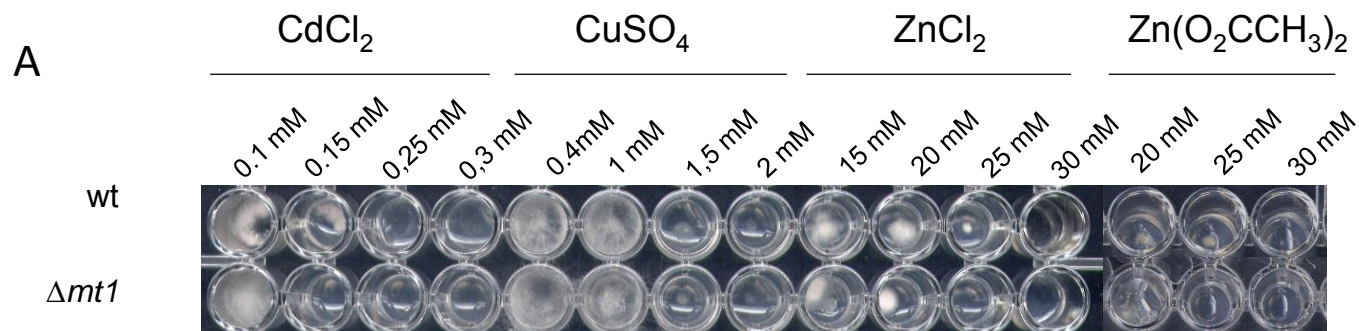
C



Supplementary Figure 1. **A)** Possible transcripts of *mt1* of *F. oxysporum* represented by exons (blue boxes) and noncoding sequences (black line). To check transcripts two primer pairs were designed. **B)** PCR1 using wt cDNA as template and primers mt1-12 (present in exon 2) and mt1-8 (present in the exon 2 of the shortest version and in the intron 2 of the largest) was negative. PCR2 using wt cDNA as template and primers mt1-12 (present in exon 2) and mt1-13 (present in exon 3 of the largest) was positive giving 267 bp amplicon. PCR 3 using wt gDNA and primers mt1-12 and mt1-8 was positive giving 208 bp amplicon. **C)** Elevated conservation of *mt1* in pathogenic fungi observed in the phylogenetic tree. Bootstrap values were obtained from 1000 replicates and are indicated at the nodes; only it has been conserved those values > 50. The pathogenic fungi were classified in: parasite (●), plant pathogen (●), opportunistic human pathogen (●), animal pathogen (●). Highlighted in blue are represented the copper resistance protein or related to Cu-binding metallothioneins, And duplicated genes are indicated (*).



Supplementary Figure 2. Distribution of stress and metal responsive elements within 1,5 kb upstream region of *F. oxysporum* *mt1*. ARE (antioxidant response element), CuSE (copper sensing elements), CuSE* (CuSE-like elements), STRE (stress responsive element), CDRE (calcineurin dependent response element).



B

Strains	MIC of heavy metals (mM)			
	CdCl_2	CuSO_4	$\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$	ZnCl_2
wt	0.3	1.5	30	30
$\Delta mt1$	0.2	1.5	25	25

Supplementary Figure 3. A) Effect of different concentration of heavy metals on wt and mutant strains growth in 96-wells plates . 30 μl of a 10^6 spores mL^{-1} suspension were inoculated in the wells containing synthetic media (SM) supplemented with different concentrations of CdCl_2 , CuSO_4 , ZnCl_2 or $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$. **B)** Minimal inhibitory concentrations (MIC) of heavy metals for wt and mutant strains of *F. oxysporum*.

5.2. Copper transporter protein CrpF protects against copper-induced toxicity in *Fusarium oxysporum*

Damaris Lorenzo-Gutiérrez,^a Lucía Gómez-Gil,^b Josep Guarro,^a M. Isabel G. Roncero,^b Javier Capilla^{*a} and Loida López-Fernández^{*a}

^aUnitat de Micologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut and IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; ^bDepartamento de Genetica, Facultad de Ciencias and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3, Universidad de Cordoba, 14071 Cordoba, Spain.

Sometido a *Virulence*

Virulence

Copper transporter protein CrpF protects against copper-induced toxicity in *Fusarium oxysporum*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Copper transporter protein CrpF protects against copper-induced toxicity in <i>Fusarium oxysporum</i>
Article Type:	Research Article
Manuscript Classifications:	Fungal pathogenesis; Genomics; Molecular biology; Pathogenesis; Virulence factors
Abstract:	<p>Copper is an essential trace element for growth and proliferation. However, copper accumulation generates toxicity. Thus, precise and tight regulation of copper homeostasis processes, including transport, delivery, storage, detoxification, and efflux machineries is required. Moreover, the copper homeostasis maintenance is critical for the survival and pathogenesis of fungal pathogens.</p> <p>Copper homeostasis has been extensively studied in mammals, bacteria, and yeast, but it has not been well-documented in filamentous fungi. In the present work, we investigated copper tolerance in the filamentous fungus <i>Fusarium oxysporum</i> by analyzing a copper transporter coding gene <i>crpF</i>, previously study in <i>Aspergillus fumigatus</i>.</p> <p>The expression pattern of <i>crpF</i> showed a strong gene induction in response to toxic copper levels. The deletion of <i>crpF</i> led to severe sensitivity to CuSO₄ toxicity in <i>F. oxysporum</i> although it did not alter the pathogenic capacity of the fungus in a murine model of systemic infection or its resistance to macrophage killing. However, the survival rates of tomato plants inoculated with the Δ<i>crpF</i> mutant were significantly higher than those plants inoculated with the wild type or complemented strains.</p>
Author Comments:	The PhD Javier Capilla and the PhD Loida Lopez should be corresponding authors, both of them.
Order of Authors Secondary Information:	JAVIER
Keywords:	Copper transport; Copper homeostasis; fungal pathogenesis; PIB-type ATPase; Crp

**Copper transporter protein CrpF protects against copper-induced toxicity in
*Fusarium oxysporum***

*Damaris Lorenzo-Gutiérrez^a, Lucía Gómez-Gil^b, Josep Guarro^a, M. Isabel G. Roncero^b,
Loida López-Fernández^{a*} and Javier Capilla^{a*}*

KEYWORDS

Copper transport; Copper homeostasis; fungal pathogenesis; P_{1B}-type ATPase; Crp

^a Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut and Institut
d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

^b Departamento de Genética, Facultad de Ciencias and Campus de Excelencia
Internacional Agroalimentario ceiA3, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain.

*Corresponding authors:

Javier Capilla: javier.capilla@urv.cat

Loida Lopez-Fernandez: loidalopezfernandez@gmail.com

Abstract

Copper is an essential trace element for growth and proliferation. However, copper accumulation generates toxicity. Thus, precise and tight regulation of copper homeostasis processes, including transport, delivery, storage, detoxification, and efflux machineries is required. Moreover, the copper homeostasis maintenance is critical for the survival and pathogenesis of fungal pathogens.

Copper homeostasis has been extensively studied in mammals, bacteria, and yeast, but it has not been well-documented in filamentous fungi. In the present work, we investigated copper tolerance in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum* by analyzing a copper transporter coding gene *crpF*, previously study in *Aspergillus fumigatus*.

The expression pattern of *crpF* showed a strong gene induction in response to toxic copper levels. The deletion of *crpF* led to severe sensitivity to CuSO₄ toxicity in *F. oxysporum* although it did not alter the pathogenic capacity of the fungus in a murine model of systemic infection or its resistance to macrophage killing. However, the survival rates of tomato plants inoculated with the Δ *crpF* mutant were significantly higher than those plants inoculated with the wild type or complemented strains.

Introduction

Within prokaryotic and eukaryotic cells, heavy metals such as copper, zinc or iron, among others, have essential roles as cofactor in several enzymatic reactions^{1, 2}. However, elevated concentrations of such metals result highly toxic since they can substitute other specific enzymatic cofactors generating biochemistry alterations³⁻⁵. Excessive accumulation of transition metals, such as copper, also promotes hydroxyl radicals generation, which induce severe cellular damage. Accordingly, biological systems have evolve strategies for the maintenance of metal homeostasis being finely controlled by cells⁶⁻⁸.

Acquisition and distribution of copper in eukaryotes have been studied in fungi, mainly in *Saccharomyces cerevisiae*^{1, 2, 9, 10}. Although many of the homeostatic mechanisms in acquiring, using and regulating Cu are conserved in other species, different fungi have evolved distinct mechanism that enable them to specialize to specific environments¹⁰.

Different studies have demonstrated that fungi can adapt to environments where metals range from limiting to excessive concentrations, the latter due to industry contaminants, inorganic fertilizers and pesticides^{11, 12}. In addition, pathogenic fungi have to cope with toxic conditions during infectious processes in mammalians, since the host uses copper compartmentalization within macrophages to deliver toxic copper during fungal infections¹³⁻¹⁵.

Nevertheless, fungi are known to harbour different features concerning copper detoxification and homeostasis mechanisms. While some use metallothioneins as main defence strategy¹⁶ others shown export proteins to regulate Cu levels.

Copper exporters ATPases belong to a superfamily of proteins known as P-type ATPases with ion pumps functions that transport specific ions across the cell membrane against concentration gradient using the energy stored in ATP¹⁷. Copper exporters ATPases due to their ability to catalyse phosphorylation of a key conserved aspartate residue within the pump and their adenosine triphosphate (ATP) source and present eight conserved functional domains. P_{1B}-type ATPases

are membrane associated proteins that traffic among ER, Golgi and plasma membrane changing their location in response to copper concentrations¹⁸ and involved in Cu⁺, Ag⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ or Pb²⁺ pumping out the cell^{19, 20}.

In *A. fumigatus* the main copper exporter is CrpA a P_{1B}-type ATPase which has been found to be the major determinant of copper resistance¹⁶. CrpA presents homologues in humans, which are hATP7A and hATP7B. The expression of *crpA* is under control of the copper-sensing transcription factor AceA as a defence mechanism against host during infection¹⁶.

Particularly copper exporter ATPases have been studied in many fungal species highlighting their essential role in fungal survival in low copper concentrations, as occurs in *Candida albicans*²⁰, or in highly toxic concentrations as occurs in *Aspergillus fumigatus*¹⁶.

Although several studies have assessed the mechanisms on metal homeostasis in *A. fumigatus*, there is a lack of knowledge in other important pathogens. Recently we have reported the identification of the only metallothionein in *F. oxysporum* (*mt1*) which seems to be activated specifically by Zn and it is involved in defence against copper and reactive oxygen species (ROS)²¹.

We focused on *F. oxysporum*, since this specie is a multi-host model organism²² showing multidrug-resistance able to cause severe disease in human beings and great losses in crops. The experimental approach of the present study was to evaluate the contribution of copper exporters in metal homeostasis and virulence in this fungus. By *in silico* search we have identified a copper exporter ATPase *crpF* in the genome of *F. oxysporum* and expression was evaluated in presence of different heavy metals. In addition, the expression of metal resistance-related genes (*mt1* and *aceA*), together with stress response genes (*prx* and *gapdh*) in wt and mutant strains in the presence of different metal ions was evaluated. This work provides a better understanding of the function of copper exporter's in *F. oxysporum* and helps to complete the picture of the role of Cu in fungal pathogenesis.

Material and methods

Fungal strains and culture conditions

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* wild type strain 4287 was used in all experiments. The fungus was stored at -80 °C with glycerol as microconidial suspension. For extraction of genomic DNA (gDNA) from mycelia and microconidia production, cultures were grown in potato dextrose broth (PDB) with shaking at 170 rpm, as previously described ²³. Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of Cd, Cu and Zn was performed in 96-well microplates containing Synthetic Medium (SM) supplemented with CdCl₂ (0.1, 0.15, 0.25 and 0.3d mM), ZnCl₂ (15, 20, 25 and 30 mM) or CuSO₄ (0.3, 0.4, 1 or 1.5 mM). Control wells consisted on SM without metals addition. Microplates were inoculated with 30 µl of a suspension containing 10⁶ spores/mL and incubated for 10 days at 28 °C.

For phenotypical characterization of colony growth, water droplets containing 10³, 5 x 10² or 10² freshly microconidia obtained from a 3 - 4 days old culture were spotted onto solid Synthetic Medium (SM) supplemented with 0.15 mM CdCl₂, 20 mM ZnCl₂ or 0.4 mM CuSO₄. Plates were incubated at 28 °C for 3 - 15 days before being photographed. For infection experiments, freshly microconidia were obtained from a 3 - 4 days old culture. For analysis of gene expression, freshly obtained microconidia were germinated in PDB at 28 °C and 170 rpm for 12 h and transferred to liquid SM medium supplemented with 0.1 mM CdCl₂, 0.175 mM CuSO₄ or 7.5 mM ZnCl₂ and incubated for other 6 h. Then, mycelium was harvested by filtration, washed with distilled water, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until its use for RNA and DNA extractions.

Nucleic acid manipulations

Total RNA and genomic DNA (gDNA) were extracted from *F. oxysporum* ground mycelium in liquid nitrogen with mortar and pestle. Total gDNA was isolated

according to previously reported protocol ²⁴ and total RNA was extracted with Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) ²⁵. DNA and RNA extractions were resuspended in DNase and RNase-free double distilled water and their quality determined by running aliquots in RedSafe-stained agarose gels and analysed in a Nanodrop2000™ spectrophotometer (Thermo Fisher). Southern analyses and probe labelling were carried out as described previously ²³ using the non-isotopic digoxigenin-labelling kit (Roche, IN, U.S.A.).

Bioinformatic

BLASTP searches were performed in order to find orthologues proteins of CrpA in *F. oxysporum* and determine sequence similarity at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and *F. oxysporum* genome database (<https://genome.jgi.doe.gov/Fusox1/Fusox1.home.html>). For phylogenetic studies, amino acid sequences were aligned using CLUSTALW algorithm ²⁶, followed by 1,000 nonparametric bootstrap analysis in MEGA v. 6.06 software ²⁷. A phylogenetic tree was built from the retrieved hits from BLASTp search, in which the most representative species of each genus were included. Phylogram was constructed using the Neighbour-Joining method.

Transmembrane domains were predicted using the web-based software Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>). Alignments visualization and domain analysis were performed with Jalview program.

Targeted gene deletion and complementation

Targeted gene replacement of entire coding region of the *crpF* (FOXG_03265) was performed using the split marker technique ²⁸. Briefly, two overlapping constructs were generated by fusion PCR using Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) to delete *crpF* gene. The 5' and 3' genomic flanking sequences of *crpF* were obtained by PCR amplifications of wild type gDNA. The promoter

fragment of 896 bp, obtained by amplification with the specific primer pair *crp*-F2n and *crp*M13F-R1, was fused to the 3' end of the hygromycin resistance (Hyg^R) cassette ²⁹ and amplified using primers M13F and *hyg*-G to generate the first construct that contains a partial sequence of Hyg^R cassette (approximately 75 %) (Table 1). The second construct contained the terminator region of *crpF* of 868 pb, obtained by amplification with the specific primer pair *crp*-M13R-F3 and *crp*-R3n, fused to the 5' end of the Hyg^R cassette, amplified using the primer pair M13R and *hyg*-Y which results in construct that contains a partial sequence of Hyg^R cassette (approximately 75 %). These two overlapping constructs were used to transform protoplasts from the *F. oxysporum* wild-type strain (Figure 3A), as reported previously ²³. Protoplasts of *F. oxysporum* were generated using 10 % (w/vol) of Extralyse (Laffort, Bordeaux, France) for digestion of cell walls ²³. The resulting Hyg^R transformants were screened by PCR (Figure 3B) and Southern blot analyses to identify homologous recombination events.

For complementation of the Δ *crpF* mutant, a 3.3 kb fragment containing the complete *crpF* gene (including promoter and terminator regions) was amplified from gDNA using primers *crp*-F1 and *crp*-R2. The amplified fragment was used to co-transform protoplast of the Δ *crpF* with the 1.4 kb nourseothricin resistance (Nat^R) cassette, amplified from plasmid pDNat1 ³⁰ using primers M13F and M13R. The resulting Nat^R transformants were screened by Southern analyses to confirm integration of *mt1*.

Expression analyses

Total RNA (1 µg) treated with DNase I (Thermo Fisher) was reverse-transcribed into first-strand complemented DNA (cDNA) with iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) using a poly-dT antisense primer, according to the manufacturer's instructions. Amplification of *mt1*, *crpF* (FOXG_03265), *aceA* (FOXG_03428), *gapdh* (FOXG_08006), *prx* (FOXG_15430) and the housekeeping *act1* (FOXG_01569) ³¹ was performed from cDNA using

specific primers designed on Oligo 7 software (Molecular Biology Insights, Inc., Colorado Springs, CO, USA) (Table 1). Endpoint PCRs were performed with (Biotaq™, Bioline) as follows: 95 °C for 5 min, 30 cycles of 35 s at 94 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C, followed by a final elongation of 7 min at 72 °C. The PCR products were visualized by electrophoresis on 1.5 % RedSafe stained agarose gels.

Cu intracellular quantification

Intracellular determination of Cu content in wt, $\Delta crpF$ and $\Delta crpF^c$ strains was performed as previously described^{32 33}. Briefly, microconidia were obtained from 3-4 days old cultures (28°C and 170 rpm) and germinated in PDB (same conditions) for 12 h. Then, germlings were transferred to liquid SM with or without 100 µM CuSO₄ and incubated for 6 or 24 hours at 28 °C and 170 rpm for biomass obtention. The mycelium was harvested by filtration, washed with distilled water containing 10 mM of citric acid in 0.5% (w/v) NaCl in order to remove copper ions adsorbed on the cell surface. *F. oxysporum* mycelium was frozen in liquid nitrogen, grinded and dried in a laboratory oven. For each measurement 40 mg of dry biomass was re-suspended in 300 µL of 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), transferred to a 2 mL screw cap tube containing 100 µL of glass microbeads and subjected to mechanical lysis by three cycles of 20 seconds at maximum speed with a Fast Prep® - FP120 instrument (Thermo Savant, Holbrook, NY). The crude extract was clarified by centrifugation at 10,000 g for 10 min and the supernatant transferred to a new tube. The clarified crude extract was diluted in 500 µL of deionized water and added to 100 µL of 1% (w/v) ascorbic acid and 400 µL of BCA reagent (0.006% (w/v) 2,2'-biquinoline-4,4'-dicarboxylic acid disodium salt hydrate) Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), 3.6% (w/v) NaOH, 15.6% (w/v) Hepes. After 2 min. of incubation at room temperature, absorbance was recorded at 354 nm using UV with a Nanodrop 2000™ spectrophotometer (Thermo Fisher). The amount of

copper is referred as mg Cu per g of dry biomass. At 354 nm the molar attenuation coefficient is 4.6×10^4 liter mol⁻¹ cm⁻¹.

Infection assays in plant, murine and macrophages cell line

Tomato root inoculation assays were performed as previously described ²³, using 2-week-old tomato seedlings (cultivar Monika, seeds kindly provided by Syngenta, Spain). Tomato roots were submerged in a spores suspension containing 5×10^6 spores mL⁻¹ of *F. oxysporum* for 30 min and then planted in vermiculite and maintained in a growth chamber. Ten plants were used for each assayed strain i.e., wt, $\Delta crpF$ and $\Delta crpF^c$. Severity of disease symptoms and plant survival was recorded daily for 30 days as previously described ³⁴. Experiments were repeated three times with similar results. Data presented are from one representative experiment.

For mice infection, four-weeks-old male OF1 mice weighing 28 - 30 g were used (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain). Groups of 8 animals were immunosuppressed by intraperitoneal administration of 200 mg/kg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratories Funk SA, Barcelona, Spain), beginning 2 days prior infection and then every 5 days until the end of the experiment. Mice were inoculated intravenously (i.v.) through the lateral tail vein, with a suspension of 10^7 or 2×10^7 microconidia per animal in 0.2 mL of sterile saline solution. Virulence was evaluated by survival through 15 days and by fungal load quantification in kidneys and lungs 7 days after infection ³⁵.

Adherent macrophage-like cell line J774.1 was maintained in tissue culture flasks at 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Biowest, MO, USA) with L-glutamine supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. For killing assays macrophages were scraped from the tissue culture flask and transferred to 6-wells culture plate in DMEM and incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂ for 20-24 h prior to the infection ³⁶. Infection was performed by adding 1.6×10^6 *F. oxysporum* germings (MOI 1) obtained from 8 h

cultures at 37 °C and 120 rpm in DMEM. The infection assay was maintained for 6h at 37°C and 5% CO₂. Then, wells were washed twice with 1X PBS in aim to remove non-phagocytosed germlings. Subsequently, cells were lysed by cold water osmotic shock and plated onto PDA for fungal viability. Experiments were done by triplicate with duplicate wells per sample.

Statistical analyses

Mean survival times on animal and plant infection were estimated from Kaplan-Meier survival curves and compared using the log rank test. The tissue burden studies results were analysed using the Mann-Whitney U test and the t test by Significance of transcriptional levels and survival rates from the macrophage-killing assay were determined using a paired t test. All statistical analyses were performed in Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA) for Microsoft Windows. *P* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Identification of copper exporter coding genes in *F. oxysporum* genome

The *in silico* analyses of putative genes coding for copper-exporters revealed the existence of six orthologs to *Aspergillus* genes in *F. oxysporum* (FOXG_03101, FOXG_07770, FOXG_01107, FOXG_01748, FOXG_11217 and FOXG_03265) that share high percentage of similarity between 49,5 %- 57,8 % of identity (Suppl. table 1) including the Cu exporter CrpA. The sequence analyses revealed a conserved CPC (Cys-Pro-Cys) copper translocation motif placed in the 6th transmembrane (TM) domain, 4 Cys rich metal binding motifs (MBD) in the cytoplasmic N-terminal, 4 predicted N-MBD as tandem repeats and 3 CxxC motifs located closer to the amino terminus followed by a GMxCxxC classical heavy metal

associated domains (HMA). All these domains have been previously described in copper-transporting ATPases of yeast, human, bacteria and archaea^{17-19, 37-42}. In common with non-heavy metal transporting P-type ATPases, CrpF shares characteristic features as an aspartyl kinase domain (DKTG), a phosphatase domain and a consensus domain for ATP binding and energy transduction (GDGINDSP)^{38, 41}.

In order to investigate the conservation degree of CrpF in fungi, a BLASTp analysis was performed to find orthologous proteins in other fungal genomes.

The phylogenetic tree constructed with the obtained sequences brought out high homology between *F. oxysporum* and other plant pathogens, such as *Claviceps purpurea* or *Neonectria ditissima* (Figure 2B). Related to *F. oxysporum* CrpF orthologs, 39% are parasitic fungi, 30% phytopathogens, 48% pathogen opportunistic humans and 48% arthropod pathogens. This Cu transporter is highly conserved between fungi with relevance in the economy due to infections of crops and in clinical. Broadly, this is indicative of the widespread nature of CrpF in species with pathogenic capacity related to *F. oxysporum*.

Target deletion of *crpF* gene

To investigate the role of *crpF* in copper tolerance and pathogenicity in *F. oxysporum*, a knockout mutant ($\Delta crpF$) was generated by gene replacement technique. By Southern analyses of the gDNA from wt and obtained transformants we detected a 7,8 kb *Sma* I hybridizing band in wt strain, that was replaced by a 3,2 kb fragment in the homologous transformant ($\Delta crpF$ #33), indicating the deletion of *crpF* gene sequence (Figure 3A and 3B). Complementation of the $\Delta crpF$ was performed by cotransformation with the *crpF* wt allele and the Nat^R cassette as selective marker. Cotransformants were identified by Southern analyses of gDNA digested with *Sac* II and *Sma* I. Complementation was confirmed on transformant $\Delta crpF$ #7, which displayed the mutant 3,2 kb *Sac* II/*Sma* I hybridizing band plus an additional band, indicating ectopic integration of the gene (Figure 3B).

CrpF contributes to copper tolerance and increase copper accumulation in *F. oxysporum* under Cu excess

The role of CrpF in *F. oxysporum* heavy metal tolerance was investigated through colony-growth experiments and evaluation of metal sensitivity on wt, knockout mutant ($\Delta crpF$) and complemented strain ($\Delta crpF^c$). The ability to tolerate Cd, Cu and Zn was assessed by determining the minimal inhibitory concentration (MIC value) to each heavy metal in SM media supplemented with different heavy metals. $\Delta crpF$ showed lower MIC to CdCl₂ (0.25 mM), CuSO₄ (0.4 mM) and ZnCl₂ (20 mM) compared to wt (Figure S1).

To better assess growth inhibition effect by metals in wt, $\Delta crpF$ and $\Delta crpF^c$ strains, we evaluated growth responses (size, shape and density) at different copper concentrations (Figure 4). As shown in figure 4, the colony growth of $\Delta crpF$ strain showed extreme reduced tolerance to 0.4 mM CuSO₄ and also higher sensitivity to 0.15 mM CdCl₂ and to a lesser extend to 20 mM ZnCl₂. Specifically, at 0.15 mM CdCl₂ and 20 mM ZnCl₂ the $crpF$ deletant exhibited a significantly lower cellular density in the central region of the colony.

Interestingly, mycelia cultured under Cd exposure showed color changes, acquiring orange tones. Some authors have reported the production of orange-brown pigments in fungal colonies, probably due to the induction of pigments that contribute to metal biosorption of Cd onto the cell walls^{43, 44}. In the case of ZnCl₂ the mycelia became thicker in the presence of ZnCl₂ compared to the control. This phenomenon of mycelial thickening has also been described in other filamentous fungi⁴⁵.

To determine whether hypersensitivity to toxic Cu may be associated to changes in intracellular Cu concentrations in $\Delta crpF$, we quantified intracellular Cu by a colorimetric assay that allows to measure the amount of Cu bound to the specific the substrate (BCA)³³.

Quantification of intracellular Cu was performed in mycelia grown during 6 hours with and without Cu addition. The results showed that $\Delta crpF$ accumulate less Cu (0.009 mg Cu/mg dry biomass) than wt strain (0.020 mg Cu/mg dry biomass in control conditions (without the addition of Cu) ($p = 0.04$) (Figure 5). Nevertheless, addition of 0.1 mM $CuSO_4$ caused an increase of Cu content in both strains exhibited up, $\Delta crpF$ exhibited higher Cu accumulation (0.076 mg Cu/mg dry biomass) than wt (0.058 mg Cu/mg dry biomass) with significant differences ($p = 0.04$) (Figure 5). Complemented strain $\Delta crpF^c$ shown similar Cu accumulation than wt, in control and metal conditions.

Expression pattern of *crpF* in response to metal toxicity

To investigate whether *crpF* is constitutively expressed or induced by metal ions, we determined the expression profile of *crpF* grown in the presence of different heavy metals. Increased *crpF*-transcript levels were detected in the wt strain in the presence of Cu ($p = 0.0015$), but not in Cd or Zn ($p > 0.33$). As expected, *crpF* was not transcribed in the $\Delta crpF$ mutant (Figure 6). To gain a better insight into metal response, we analysed other key genes involved in metal homeostasis and stress response in fungi. The expression of *mt1* (coding for a hypothetical metallothionein), *aceA* (coding for transcription factor), *prx* (coding for peroxiredoxin with antioxidative activity) and *gapdh* (coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase known to act as oxidative sensor) was determined. Under control, Cd and Cu conditions, wt and mutant strains displayed different transcript levels of *aceA*, although there were not statistically significant differences. The *aceA* expression in $\Delta crpF$ was up-regulated in control ($p = 0.22$) and down-regulated in Cd ($p = 0.11$) and Cu ($p = 0.18$). On the other hand, Zn potently induces *mt1* in $\Delta crpF$ ($p = 0.0029$), this overexpression being much greater in the mutant than in the wt ($p = 0.0063$).

Regarding stress response, upregulation of *gapdh* under Zn exposure but not in the presence of other metals was detected in wt and $\Delta crpF$ strains ($p = 0.044$ and

p = 0.013, respectively). In general, $\Delta crpF$ showed slightly lower transcript levels of *gapdh* than wt in all conditions except in presence of Zn, especially with statistical significance in control (p = 0.018) and Cu (p = 0.0025). Another marked difference observed in the mutant is the overexpression of the antioxidant gene *prx* under Zn exposure in comparison with control conditions (p = 0.008) or to wt strain (p = 0.006). Although $\Delta crpF$ showed lower expression levels than wt of *prx* in the control (p = 0.010) and Cd (p = 0.0009) conditions.

The lack of *crpF* reduces *Fusarium oxysporum*'s ability to infect tomato plants but does not affect virulence in mice infection or resistance to macrophage killing

The lack of *crpF* alters the pathogenic capacity of *F. oxysporum* in tomato plants (Figure 7C). When tomato roots were inoculated with microconidial suspensions of the different fungal strains development of vascular wilt symptoms and mortality was significantly lower (p < 0.0001 and p = 0.0020, respectively) in plants infected with the $\Delta crpF$ mutant than in those infected with the wild type or the complemented strain (Figure 7C).

However, in the macrophage infection not relevant differences between $\Delta crpF$ and wt were detected, as $\Delta crpF$ did not display lower resistance to macrophage killing versus wt strain (p = 0.23) (Figure 7D). Quantification of surviving phagocytized conidia after 6 h of infection showed a 3.3 % of viable CFU of $\Delta crpF$, a similar value to that detected in the wt (4.1%).

As the tomato pathogenic *F. oxysporum* strain can also infect and kill immunosuppressed mice ²², we tested the role of *crpF* during infection of a mammalian host. Mortality rates of immunosuppressed mice infected with wt and $\Delta crpF$ strains resulted in 37,5% and 75 % respectively, after challenge with 1 x 10⁷ CFU/animal (p = 0.054) (Figure 7A). Surprisingly, this mutant was more virulent than the wild-type strain when inoculated into mice with significant differences. The fungal burden in lung was higher in $\Delta crpF$ versus wt at 1 x 10⁷ CFU/animal (p =

0.0016) (Figure 7B). Also, no differences in mortality rates among strains were observed when infected with higher inocula 2×10^7 CFU/animal (data not shown). These results suggest that CrpF contributes to the virulence of *F. oxysporum* in plants, but is not required for virulence nor dissemination in a mammalian host.

Discussion

Copper is one of the main essential trace metals required as micronutrient for growth and proliferation in all biological systems. In fungi, both copper deficiency and overload can be harmful, leading to the misregulation of metabolic processes and the alteration of intracellular redox potential. However, organisms have developed mechanisms to adapt to metal fluctuations and to maintain ion homeostatic balance.

Maintaining copper homeostasis is critical for fungal survival and pathogenesis, and therefore fungi have evolved sophisticated machinery to regulate copper homeostasis to survive under host-imposed toxicity. Recently, some strategies based on inhibiting the regulators of copper homeostasis have emerged as an opportunity to improve therapeutic options for aspergillosis^{15 14} expanding therapeutic and phytosanitary strategies. Another strategy to create a hostile antimicrobial environment is through antifungal agents that function as copper ionophores, including 8-hydroxyquinoline (8HQ), zinc pyrithione (ZPT) or boronic ester-masked 8-hydroxyquinoline derivative (QBP)¹⁵. Cu ionophores can coordinate and translocate Cu from the extracellular environment to the intracellular space. Recently, QBP has been used as antifungal agent to inhibit growth of *C. neoformans* in lungs¹⁴. Copper tolerance is a critical point for fungal pathogenesis, since host cells can inhibit microbial growth by copper poisoning. Accordingly it has been proposed that pharmacological disruption of copper resistance genes, such as *crpA*, could lead to promising strategies for the development of new antifungal therapies.¹⁵ It is remarkable that the *A. fumigatus*

copper exporter CrpA has cysteine-rich copper-binding motifs (MBD) in its N-terminus, which are not present in the human homolog, which could significantly increase the hypothetical efficacy of that antifungal therapeutic target ¹⁵.

Considering the importance of metal ions, copper uptake and export systems are expected to have a strong impact in fungal resistance and virulence. To reach a new understanding of copper as a possible virulence factor in human fungal pathogens, we have focused this study on the opportunistic pathogen *F. oxysporum*. For this purpose, we have conducted an *in silico* search in the *F. oxysporum* genome, which has allowed to identify a total of 6 genes coding for hypothetical copper transporters orthologs to *S. cerevisiae* and *A. fumigatus*. We have focused on CrpF, the putative homologue of the copper exporter ATPase CrpA of *A. fumigatus* (CrpA, AfuA_3G12740) which is involved in copper tolerance and virulence. The importance of this gene is reflected in the high conservation of this metal transporter and genetic duplications. Particularly mutations in the human homologues *crp* genes ATP7A and ATP7B cause X-linked Menkes disease and autosomal recessive Wilson's disease, respectively ⁴⁶. Both genetic disorders are related with a defective copper homeostasis, leading to copper deficiency in Menkes disease and toxicity through hepatic copper accumulation in Wilson's disease ⁴⁷.

Copper transporters with high similarity to CrpF have been well described in many fungal organisms in addition to *A. fumigatus*, as *C. albicans* (CaCrp1p, AAF78958.1), *A. nidulans* (CrpA, CBF83376.1) and *A. flavus* (AFLA_020960, AFLA_053470). All characterized Crp proteins from filamentous fungi display the following conserved domains: i) eight transmembrane helix (TMH) that contains the highly conserved CPC ⁴⁸ motif within the TMH₆ characteristic for the Cu-ATPases, ii) metal binding domains (MBD) conformed by specific copper-binding sequence located within the NH₂-terminal containing the consensus CxxC motifs and iii) other heavy metal associated domains (HMA) containing the consensus GMxCxxC ^{18, 49}. Particularly the *F. oxysporum* CrpF exhibits high homology to the respective orthologs of *Aspergillus sp.*, ranging from 42.3 % to 47.3 % of identity.

Although the presence of metal binding domains indicates the metalloregulator activity of metal transporters, much remains to be established concerning their metal ion specificity, as there are many metal transporters with a wide range of metal specificity^{1, 50}.

As occurs in *Candida albicans* and other *Aspergillus* species^{20, 51, 52}, deletion of *crpF* led to a severe sensitivity to Cu²⁺ in *F. oxysporum*. Beside Cu, $\Delta crpF$ also exhibited sensitivity to Cd and Zn, suggesting no substrate specificity of this metal transport.

Metal sensing and transcriptional response is also indicative of intrinsic metal specificity. Previous studies have reported that after metal loading the detoxifying P_I-type ATPase activity is enhanced, either by its overexpression or by modifying its subcellular localization^{39 20 47 53}. A case in point is the ATPase PcaA from *A. fumigatus* which is inducible by copper or cadmium, and its lack causes deficiency in Cd tolerance⁵⁴. Also the P-type ATPase CaCRP1 in *Candida albicans* is induced by extracellular copper, being essential to cope with low Cu environment and conferring resistance to high copper concentration by ion extrusion^{20, 39}. In *A. fumigatus*, CrpA is characterized by removing excess metals from intracellular to the extracellular environment, being critical for both Cu and Zn detoxification while ZrcA transporter has a dominant role in Zn detoxification⁵². However, the transcriptional regulation of *crpA* is yet to be clarified, and further studies are required to determine the nature of its induction by metal ions.

Here, we have confirmed by transcriptional studies and tolerance assays that *crpF* is copper-inducible. Even though the lack of *crpF* strongly decreases Cu tolerance, higher sensitivity to Cd and Zn was also observed in $\Delta crpF$ compared to wt. However, neither the presence of Cd nor Zn seems to induce the expression of this metal transporter in *F. oxysporum*, which indicates its copper sensing specificity. Together these results indicate that CrpF-mediated heavy metal detoxification is not restricted to Cu but also to Cd and Zn despite being a specific copper inducible gene.

Extended transcriptional analysis of metal responsive genes or stress related genes demonstrated that the lack of *crpF* lead to a strong activation of the metallothionein *mt1* and the peroxiredoxin *prx* in the presence of Zn, both related

to metal toxicity and oxidative stress respectively ^{21, 55}. We hypothesize that Zn sensing and regulation is tightly controlled in cells, thus toxic concentrations may activate the expression of *mt1* in order to metal-buffering ²¹ and *prx* to cope with the oxidative stress cause by intracellular copper excess ³². This may indicate that *crpF* would be indirectly participating in Zn homeostasis although its absence has almost no impact on the tolerance to this metal ion in *F. oxysporum*.

The *aceA*-transcript levels in the presence of toxic metals in the wt strain were higher than in control conditions but without statistical differences. This transcription factor regulates the expression of copper and zinc transporters in *A. fumigatus* (Wiemann et al., 2017; Cai et al., 2018). In *A. nidulans*, the role of AceA in *crpA* gene regulation was demonstrated by the absence of expression of *crpA* in the $\Delta aceA$ strain (Antsotegi-Uskola et al., 2017). In the case of *F. oxysporum*, the deficiency of *crpF* does not increase *aceA* transcription under metal toxic conditions, which may indicate that other transcription factors may be controlling metal stress response in this fungus.

Evidence of the direct participation of CrpF in the copper transport was observed by the greater accumulation of intracellular Cu in the $\Delta crpF$ strain under excess Cu exposure. However, the opposite occurs in a control medium without the addition of metals, in which the mutant has less accumulation of Cu. Although those patterns in the mutant strain did not significantly differ from the wt, all together indicate that CrpF contributes to cellular homeostasis as a protective response, exporting Cu when intracellular Cu is elevated or enable maintenance of Cu levels when is scarce.

Regarding the role of CrpF in fungal pathogenesis, our data indicates that $\Delta crpF$ displayed hardly any deficiency in pathogenic capacity in a murine model of systemic infection, nor in macrophage infection. The ratio CFU recovered/inoculum was decreased in $\Delta crpF$ but not significantly, suggesting the participation of other metal transporter proteins in copper detoxification. This contrasts with the fact that other copper transporter proteins are relevant fungal virulence factor during mice infection. As in the case of *A. fumigatus*, in which spore survival assays in murine alveolar macrophages showed significantly reduced viability of $\Delta crpA$ mutant ¹⁶.

On the contrary, the lack of *crpF* does dramatically reduce the virulence of *F. oxysporum* in tomato plant infection. Specifically, the mean survival rate was duplicated in plants infected with $\Delta crpF$ comparing to plants infected with wt spores. Although plants do not elicit defence responses with metals during infection, as occurs in macrophages, probably the lack of CrpF in *F. oxysporum* leads to an intracellular Cu imbalance, making the fungus more vulnerable or less efficient for plant colonization. Nevertheless, our results diverge from those reported in other fungal Crp proteins studied. For instance, in *A. flavus* the ATPase copper transporters CrpA and CrpB contribute to virulence in animal infection model, but not in plant infection⁵¹. The differences between our results and those obtained from *A. flavus* point out to specific impact of Crp transporters in mammalian and plant hosts which deserves deeper study. Thus, our study reflects how essential genes for fungal virulence in plant host may not be relevant factors for the development of infections in organisms in the animal kingdom.

In conclusion, this work provides a better understanding of the function of copper exporter's in *F. oxysporum* and helps to complete the picture of the role of Cu in fungal pathogenesis.

Conclusions

We have detected a P_i-Type ATPase CrpF in the *F. oxysporum* genome that shows the typical structure and domains distribution described for that family of proteins. Particularly, the presence of cysteine-rich metal binding domains reinforces the hypothesis of its involvement in copper resistance. The present study provides the first evidence that the *F. oxysporum* copper exporter CrpF contributes significantly to increasing tolerance to Cu, Cd and Zn, and is essential for fungal pathogenesis in plant infection. This metal transporter is a metal-responsive gene as copper availability regulates its transcription. In addition, the $\Delta crpF$ response to Zn stress led to enhanced transcription of *prx* which usually is

activated under cellular oxidative stress. This seems to indicate that $\Delta crpF$ apparently undergoes oxidative stress in the presence of metals, possibly due to the activation of other mechanisms that would be contributing to metal tolerance. Nevertheless, loss of function of *crpF* does not impair infection ability of the fungus in mice or macrophage infections. Interestingly, $\Delta crpF$ mutant seems to be affected in the export of Cu, since it suffers accumulation of intracellular Cu beyond homeostatic levels. Unfortunately, there are still few reports describing the role of P₁-Type ATPases in fungal pathogenesis. For instance, deletion of *crpA* and *crpB* in a pathogenic strain of *A. flavus* decreases its virulence in a mouse model of invasive aspergillosis⁵¹.

In conclusion, CrpF plays an important role in Cu detoxification transporting across membranes copper excess. Considering that the advance in the knowledge of the mechanisms involved in fungal copper homeostasis will be helpful in order to reach a better understanding of the fungal infections and host-fungus interactions we believe that further research is required.

Conflict of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Prof. Silvia Atrián for her inspiring work and for introducing us into the fungal metalloproteins world and the staff in the Microbiology Unit of the University Rovira i Virgili (URV), Carme Sanmartí and Nuria Pilas, for their technical assistance.

References

- 585 1. Gerwien F, Skrahina V, Kasper L, Hube B, Brunke S. Metals in fungal
586 virulence. *FEMS microbiology reviews* 2017; 42.
- 587 2. Nevitt T, Ohrvik H, Thiele DJ. Charting the travels of copper in eukaryotes
588 from yeast to mammals. *Biochimica et biophysica acta* 2012; 1823:1580-93.
- 589 3. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity
590 and the environment. *Experientia supplementum* (2012) 2012; 101:133-64.
- 591 4. Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq QM. Heavy Metals and
592 Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of
593 Antioxidants. *International journal of molecular sciences* 2015; 16:29592-630.
- 594 5. Valasatava Y, Rosato A, Furnham N, Thornton JM, Andreini C. To what
595 extent do structural changes in catalytic metal sites affect enzyme function?
596 *Journal of inorganic biochemistry* 2018; 179:40-53.
- 597 6. Chandrangu P, Rensing C, Helmann JD. Metal homeostasis and
598 resistance in bacteria. *Nature reviews* 2017; 15:338-50.
- 599 7. Bashir K, Rasheed S, Kobayashi T, Seki M, Nishizawa NK. Regulating
600 Subcellular Metal Homeostasis: The Key to Crop Improvement. *Frontiers in plant*
601 *science* 2016; 7:1192.
- 602 8. Balamurugan K, Schaffner W. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering
603 on a tightrope. *Biochimica et biophysica acta* 2006; 1763:737-46.
- 604 9. Li C, Li Y, Ding C. The Role of Copper Homeostasis at the Host-Pathogen
605 Axis: From Bacteria to Fungi. *International journal of molecular sciences* 2018; 20.
- 606 10. Smith AD, Logeman BL, Thiele DJ. Copper Acquisition and Utilization in
607 Fungi. *Annual review of microbiology* 2017; 71:597-623.
- 608 11. Zafar S, Aqil F, Ahmad I. Metal tolerance and biosorption potential of
609 filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource*
610 *technology* 2007; 98:2557-61.

- 611 12. Luna C, K. Marcos., Rodrigues Vieira K, Okada K, Campos-Takaki GM, do
612 Nascimento AE. Copper-induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in
613 *Aspergillus niger* UCP1261. Electronic Journal of Biotechnology 2015; 18:418-27.
- 614 13. Besold AN, Culbertson EM, Culotta VC. The Yin and Yang of copper during
615 infection. J Biol Inorg Chem 2016; 21:137-44.
- 616 14. Festa RA, Helsel ME, Franz KJ, Thiele DJ. Exploiting innate immune cell
617 activation of a copper-dependent antimicrobial agent during infection. Chemistry &
618 biology 2014; 21:977-87.
- 619 15. Song J, Li R, Jiang J. Copper Homeostasis in *Aspergillus fumigatus*:
620 Opportunities for Therapeutic Development. Frontiers in microbiology 2019;
621 10:774.
- 622 16. Wiemann P, Perevitsky A, Lim FY, Shadkchan Y, Knox BP, Landero
623 Figueora JA, et al. *Aspergillus fumigatus* Copper Export Machinery and Reactive
624 Oxygen Intermediate Defense Counter Host Copper-Mediated Oxidative
625 Antimicrobial Offense. Cell reports 2017; 19:2174-6.
- 626 17. Kuhlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. Nat
627 Rev Mol Cell Biol 2004; 5:282-95.
- 628 18. Antsotegi-Uskola M, Markina-Inarrairaegui A, Ugalde U. Copper Resistance
629 in *Aspergillus nidulans* Relies on the PI-Type ATPase CrpA, Regulated by the
630 Transcription Factor AceA. Frontiers in microbiology 2017; 8:912.
- 631 19. Scarborough GA. Structure and function of the P-type ATPases. Current
632 opinion in cell biology 1999; 11:517-22.
- 633 20. Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari BZ, Kornitzer D. The high copper
634 tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. Proceedings of the
635 National Academy of Sciences of the United States of America 2000; 97:3520-5.

21. Lorenzo-Gutierrez D, Gomez-Gil L, Guarro J, Roncero MIG, Fernandez-Bravo A, Capilla J, et al. Role of the *Fusarium oxysporum* metallothionein Mt1 in resistance to metal toxicity and virulence. *Metallomics* 2019; 11:1230-40.
22. Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, et al. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and immunity* 2004; 72:1760-6.
23. Di Pietro A, Roncero MI. Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* 1998; 11:91-8.
24. Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 1997:4692-3.
25. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1993; 15:532-4, 6-7.
26. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 1994; 22:4673-80.
27. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 2013; 30:2725-9.
28. Catlett NL, Lee BN, Poder OC, Turgeon G. Split-Marker Recombination for Efficient Targeted Deletion of Fungal Genes. *Fungal Genet Biol* 2003; 50:9-11.
29. Carroll AM, Sweigard JA, Valent B. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genet Newsl* 1993; 41:22.
30. Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Zadra I, Kuck U. Homologous recombination in the antibiotic producer *Penicillium chrysogenum*: strain DeltaPcku70 shows up-

663 regulation of genes from the HOG pathway. Applied microbiology and
664 biotechnology 2010; 85:1081-94.

665 31. Lopez-Berges MS, Risipail N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A. A nitrogen
666 response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the
667 protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. The Plant cell 2010; 22:2459-75.

668 32. Adamo GM, Brocca S, Passolunghi S, Salvato B, Lotti M. Laboratory
669 evolution of copper tolerant yeast strains. Microbial cell factories 2012; 11:1.

670 33. Brenner AJ, Harris ED. A quantitative test for copper using bicinchoninic
671 acid. Analytical biochemistry 1995; 226:80-4.

672 34. Lopez-Berges MS, Capilla J, Turra D, Schafferer L, Matthijs S, Jochl C, et
673 al. HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and
674 virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. The Plant cell 2012;
675 24:3805-22.

676 35. Ruiz-Cendoya M, Pastor FJ, Capilla J, Guarro J. Treatment of murine
677 *Fusarium verticillioides* infection with liposomal amphotericin B plus terbinafine.
678 International journal of antimicrobial agents 2011; 37:58-61.

679 36. Schafer K, Bain JM, Di Pietro A, Gow NA, Erwig LP. Hyphal growth of
680 phagocytosed *Fusarium oxysporum* causes cell lysis and death of murine
681 macrophages. PloS one 2014; 9:e101999.

682 37. Arioiz C, Li Y, Wittung-Stafshede P. The six metal binding domains in human
683 copper transporter, ATP7B: molecular biophysics and disease-causing mutations.
684 Biometals 2017; 30:823-40.

685 38. Inesi G, Pilankatta R, Tadini-Buoninsegni F. Biochemical characterization of
686 P-type copper ATPases. The Biochemical journal 2014; 463:167-76.

687 39. Riggle PJ, Kumamoto CA. Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in
688 resistance to copper and silver ion toxicity. Journal of bacteriology 2000; 182:4899-
689 905.

- 690 40. Migocka M. Copper-transporting ATPases: The evolutionarily conserved
691 machineries for balancing copper in living systems. IUBMB life 2015; 67:737-45.
- 692 41. Palmgren MG, Nissen P. P-type ATPases. Annual review of biophysics
693 2011; 40:243-66.
- 694 42. Rosenzweig AC, Arguello JM. Toward a molecular understanding of metal
695 transport by P_(1B)-type ATPases. Current topics in membranes 2012; 69:113-36.
- 696 43. Mohammadian Fazli M, Soleimani N, Mehrasbi M, Darabian S, Mohammadi
697 J, Ramazani A. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal
698 potential. Journal of environmental health science & engineering 2015; 13:19.
- 699 44. Jarosz-Wilkolazka A, Graz M, Braha B, Menge S, Schlosser D, Krauss GJ.
700 Species-specific Cd-stress response in the white rot basidiomycetes *Abortiporus*
701 *biennis* and *Cerrena unicolor*. Biometals 2006; 19:39-49.
- 702 45. Ezzouhri L, Castro E, Moya M, Espinola F, Lairini K. Heavy metal tolerance
703 of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. African
704 Journal of Microbiology Research 2009; 3:035-48.
- 705 46. Ferreira CR, Gahl WA. Disorders of metal metabolism. Translational science
706 of rare diseases 2017; 2:101-39.
- 707 47. Suzuki M, Gitlin JD. Intracellular localization of the Menkes and Wilson's
708 disease proteins and their role in intracellular copper transport. Pediatr Int 1999;
709 41:436-42.
- 710 48. Lenartowicz M, Grzmil P, Shoukier M, Starzynski R, Marciniak M, Lipinski P.
711 Mutation in the CPC motif-containing 6th transmembrane domain affects
712 intracellular localization, trafficking and copper transport efficiency of ATP7A
713 protein in mosaic mutant mice--an animal model of Menkes disease. Metallomics
714 2012; 4:197-204.

49. Cater MA, La Fontaine S, Mercer JF. Copper binding to the N-terminal metal-binding sites or the CPC motif is not essential for copper-induced trafficking of the human Wilson protein (ATP7B). *The Biochemical journal* 2007; 401:143-53.
50. Ouziad F, Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of plant physiology* 2005; 162:634-49.
51. Yang K, Shadkchan Y, Tannous J, Landero Figueroa JA, Wiemann P, Osherov N, et al. Contribution of ATPase copper transporters in animal but not plant virulence of the crossover pathogen *Aspergillus flavus*. *Virulence* 2018; 9:1273-86.
52. Cai Z, Du W, Zhang Z, Guan L, Zeng Q, Chai Y, et al. The *Aspergillus fumigatus* transcription factor AceA is involved not only in Cu but also in Zn detoxification through regulating transporters CrpA and ZrcA. *Cellular microbiology* 2018; 20:e12864.
53. Cobbold C, Ponnambalam S, Francis MJ, Monaco AP. Novel membrane traffic steps regulate the exocytosis of the Menkes disease ATPase. *Human molecular genetics* 2002; 11:2855-66.
54. Bakti F, Sasse C, Heinekamp T, Pocsi I, Braus GH. Heavy Metal-Induced Expression of PcaA Provides Cadmium Tolerance to *Aspergillus fumigatus* and Supports Its Virulence in the *Galleria mellonella* Model. *Frontiers in microbiology* 2018; 9:744.
55. Garrido EO, Grant CM. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Molecular microbiology* 2002; 43:993-1003.

Figure legends

Figure 1. Sequence analysis of the copper transporter CrpF. Proposed two-dimensional model of CrpF (FOXG_03265) protein describing predicted metal binding motifs (metal binding domains or heavy metal associated domains), conserved functional domains (phosphatase domain, Cu translocation domain, aspartyl kinase domain, ATP binding domain) and structural domains (8 transmembrane domains).

Figure 2. *F. oxysporum* contains a putative copper exporter in its genome. A)

Alignment of the amino acid sequences of the predicted copper exporter ATPases encoded by gene FOXG_03265 and the corresponding ortholog gene *crpA* from *A. fumigatus* using Clustal method. Protein accession numbers are reported as follows: *Aspergillus fumigatus* CrpA (AFUA_3G12740) and *Fusarium oxysporum* CrpF (FOXG_03265). **B)** CrpF is highly conserved among fungi kingdom. Phylogram of predicted fungal CrpF proteins in *F. oxysporum* and closer fungal species constructed using Neighbour-Joining method. Bootstrap values obtained from 1000 replicates are indicated at the nodes. Scale bar indicates the relative length of each branch. Clustal W was used for protein alignment.

Figure 3. Targeted deletion of the *F. oxysporum crpF* gene. A) Target gene replacement strategy using a disruption construct obtained by fusion PCR with Hygr^R cassette as selective marker. Relative positions of primers used for PCR and probe (dashes bars) are indicated. **B)** Southern blot analysis of gDNA from wt

strain and transformants. gDNAs were digested with *Sma* I and *Sac* II to detect deletion and complementation of *mt1*.

Figure 4. Loss of *crpF* impairs growth of *F. oxysporum* under cadmium, copper and zinc exposure. Fungal colonies from wt, $\Delta crpF$ and complemented $\Delta crpF^c$ strains grown for 6-7 days at 28 °C on SM plates containing 0.15 mM cadmium ($CdCl_2$), 0.4 mM copper ($CuSO_4$) or 20 mM zinc ($ZnCl_2$). The number of inoculated spores is indicated.

Figure 5. Intracellular copper determination. Copper concentration was quantified on mycelia from wt and $\Delta crpF$ strains grown in SM (control) and SM supplemented with 0.1 mM $CuSO_4$. The amount of Cu is reported as mg g⁻¹ biomass. Values are the average of three replicates.

Figure 6. Transcriptional analyses of *crpF*, metal homeostasis *mt1* and *aceA* and stress *prx* and *gapdh* related genes by RT-PCR analysis. Transcript levels of *act*, *mt1*, *crpF*, *aceA*, *prx* and *gapdh* from wt and $\Delta crpF$ strains on control condition and under exposure to 0.1 mM $CdCl_2$, 0.175 mM $CuSO_4$ or 7.5 mM $ZnCl_2$ are shown.

Figure 7. Pathogenic behaviour of $\Delta crpF$ in different infection models. A) Virulence of *F. oxysporum* strains in immunosuppressed murine model host inoculated with 10⁷ microconidia of the indicated strains by lateral tail vein injection.

Percentage survival values were plotted for 15 days. **B)** Fungal load quantification of lung and kidney from eight randomly chosen surviving mice from each strain at day 7 after infection using CFU estimation method. **C)** Gene *crpF* is essential for virulence of *F. oxysporum* in a plant model of infection. Survival of groups of 10 tomato plants inoculated by immersing the roots into a suspension of 5×10^6 freshly obtained microconidia mL^{-1} of the indicated strains. Experiments were performed at least three times with similar results and the percentage survival values were plotted for 30 days from one representative experiment. **D)** Percentage of viable hypha recovered after 6 h of co-cultivation with macrophages. Data are means of results from duplicated samples from three independent experiments.

798 **Table 1.** Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence (5' → 3')	Position to ATG	Experimental use
CrpF-F1	GGTAGTTTTGCTTCTGCTGTT	-1021 (s)	<i>ΔcrpF</i> construction, complementation
CrpF-M13F-R1	<i>gtcgtgactgggaaaaccctggcg</i> GCGTTGTGTGTTGTGATGAAA	- 43 (as)	<i>ΔcrpF</i> construction, probe
CrpF-M13R-F3	<i>tcctgtgtgaaattgtatccgcf</i> TTAGGAATGGCGGTAGTGGT	+ 3341 (s)	<i>ΔcrpF</i> construction
CrpF-R4n	ACCGCAAACAGTCAAATCCTTC	+ 3848 (as)	<i>ΔcrpF</i> construction
CrpF-R2	AGTGAATGTGTAAGCCAGTGT	+ 4341 (as)	<i>ΔcrpF</i> construction, complementation
CrpA-F2n	TGGTCCCCTTTCTCAAGGTG	- 918 (s)	<i>ΔcrpF</i> construction, probe
CrpF-F5	CCGTTGCTCTGCCGTATCTT	- 556 (s)	<i>ΔcrpF</i> construction
CrpF-R6	TCCTCTCCTCTCCTCTCCAC	+ 4610 (as)	<i>ΔcrpF</i> construction
CrpF-F4	TGATTGCTCCCTCTTACACG	+ 73 (s)	RT-PCR
CrpF-R4	GCTACTCTCCCCGTCAACCT	+ 280 (as)	RT-PCR
act-9	GCGGTTACACTTTCTCCACCA	+587 (s)	RT-PCR
act-10	TTGAAGGTGGTGACATGGATAC	+818 (as)	RT-PCR
mt1-12	TGCTCATGCGGTCAAAAGTCC	+150 (s)	RT-PCR
mt1-13	CCATCAGCAGCCTTCTCGCA	+396 (as)	RT-PCR
G3PDH-F1	ACCACCGTCCACTCCTACAC	+139 (s)	RT-PCR
G3PDH-R2	GATCTGGTCGTAAGAAGCACC	+367 (as)	RT-PCR
Peroxi-F1	GCCTTCACCATCCGATCCGT	+438(s)	RT-PCR
Peroxi-R2	GGCTTGACGATGCGGAACTC	+666(as)	RT-PCR
hyg-G	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA		Hyg ^R cassette
hyg-Y	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA		Hyg ^R cassette
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC		Hyg ^R cassette, Nat ^R cassette
M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA		Hyg ^R cassette, Nat ^R cassette
M13F2	GCATTCTGGGTAAACGACTC		Hyg ^R cassette, PCR verification
M13R2	CGAGACCTAATACAGCCCC		Hyg ^R cassette

799

800 Italics and lower case indicate nucleotide sequences added for cloning purposes. Positions are referred to the
801 start codon, (+) downstream or (-) upstream of ATG. Orientation is indicated, (s) sense, (as) antisense.

Kevin Tyler
Editor-in-Chief

Virulence

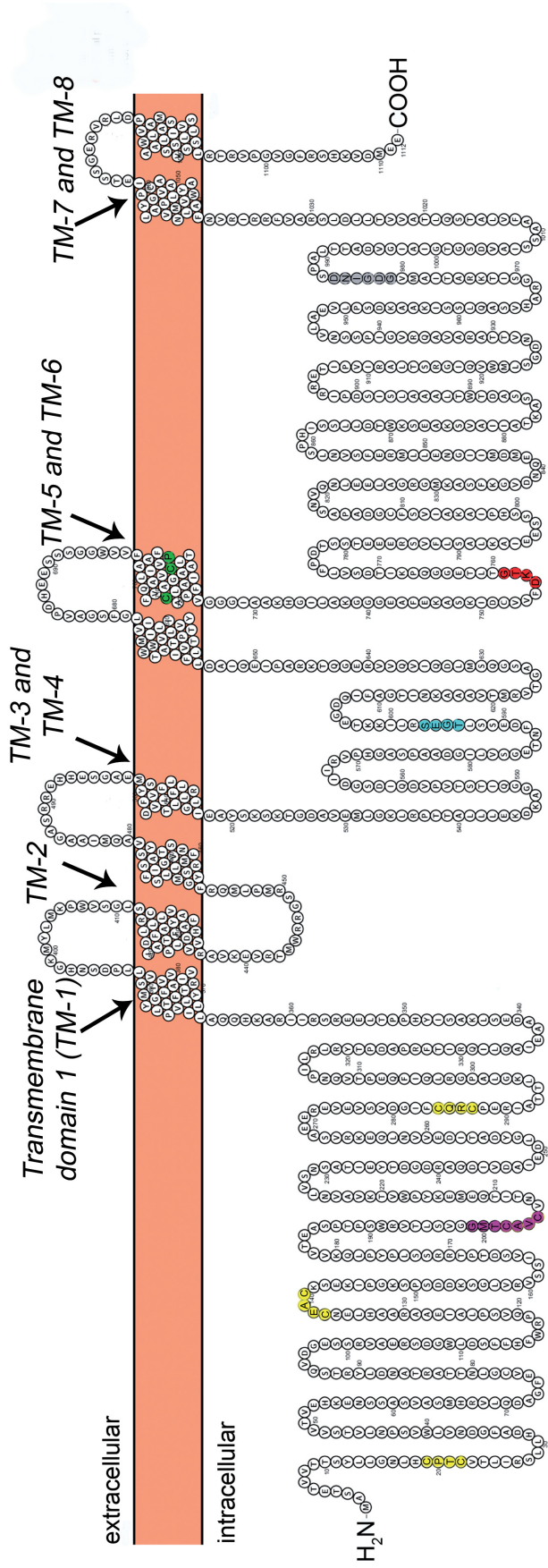
Reus, January 7, 2020

Dear Editors,

We respectfully request that you consider the enclosed manuscript entitled **“Copper transporter protein CrpF protects against copper-induced toxicity in *Fusarium oxysporum*”** for publication in *Virulence*. The relevance of this research resides in providing data that reinforce the role of metal ions in the virulence of the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, not explored before. This is the first time that CrpF, involved in copper export, is reported as a new potential virulence factor in this genus. All the material included in the manuscript is original and unpublished, and does not infringe any personal or other copyright or property rights. All the authors have read and comply with the instructions and stated conditions provided in the instructions to authors. We are confident that *Virulence* is the most appropriate journal to share this important information to the suitable readership.

Sincerely yours,

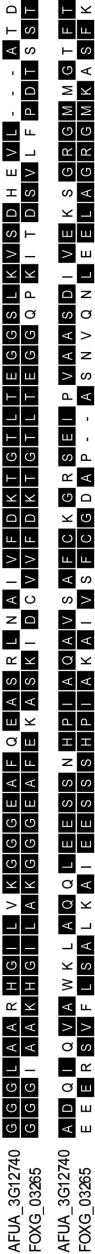
Ph.D. Javier Capilla and Ph.D. Loida Lopez



- Metal binding domain (MBD)
- Heavy metal associate domain (HMA)
- Phosphatase domain
- Cu translocation domain
- Aspartyl kinase domain
- ATP binding domain

Figure 1

A



B

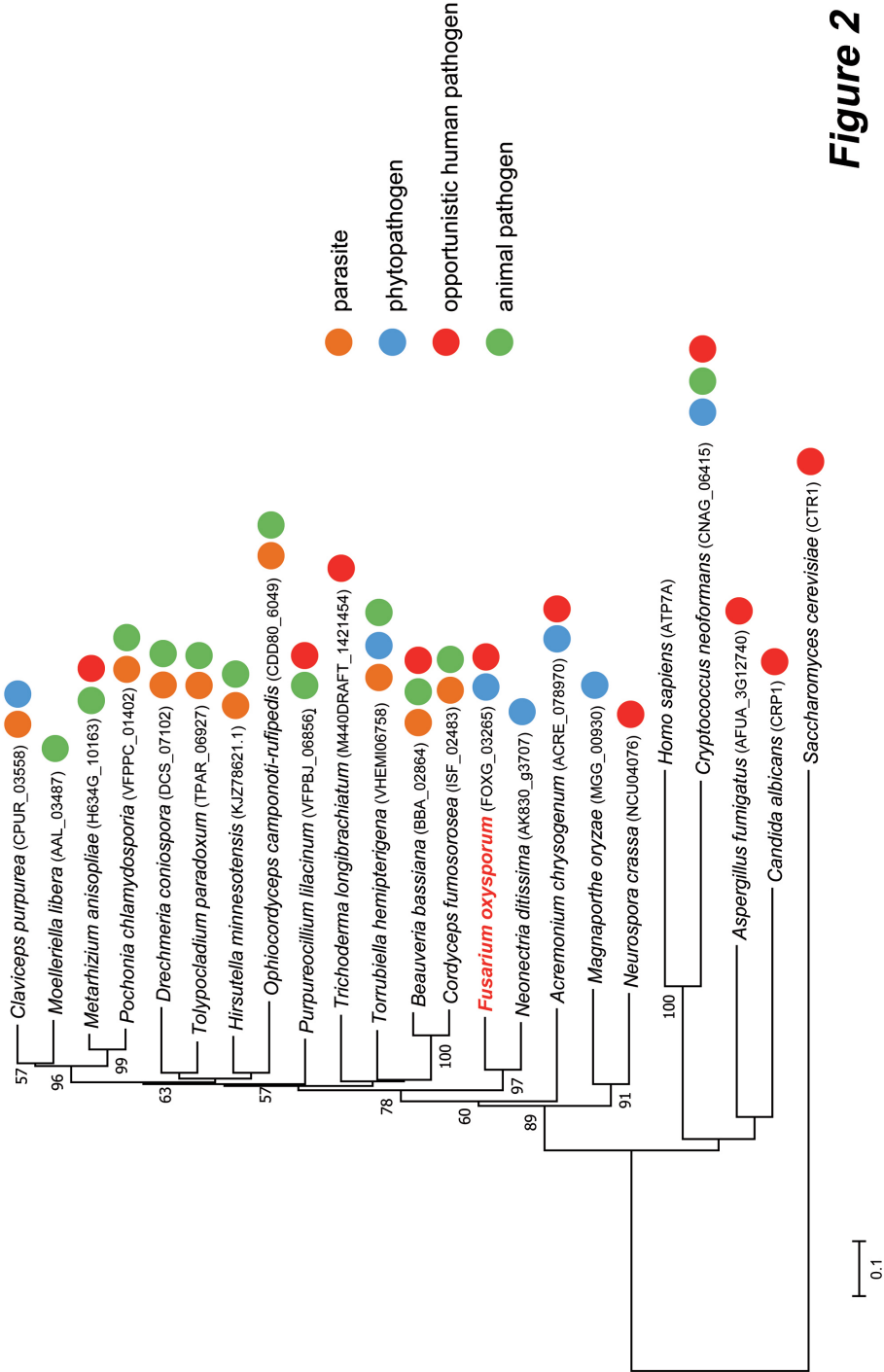


Figure 2

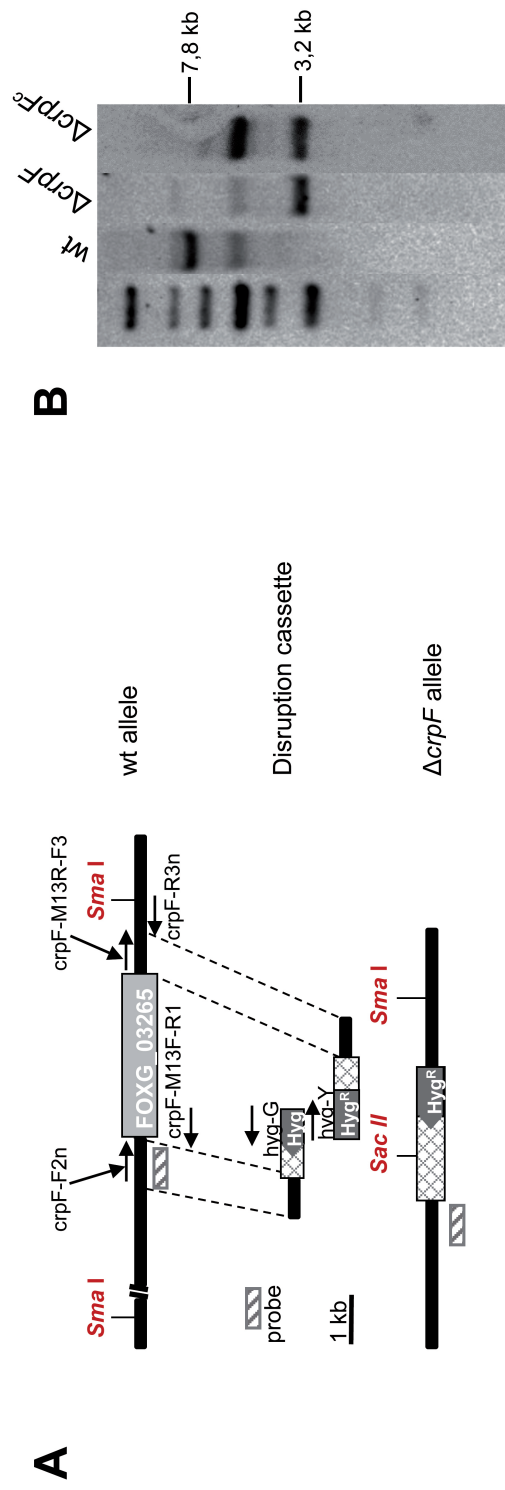


Figure 3

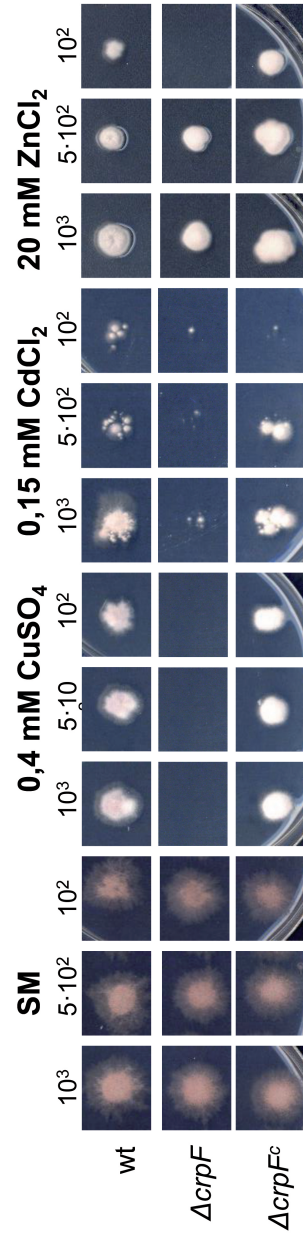


Figure 4

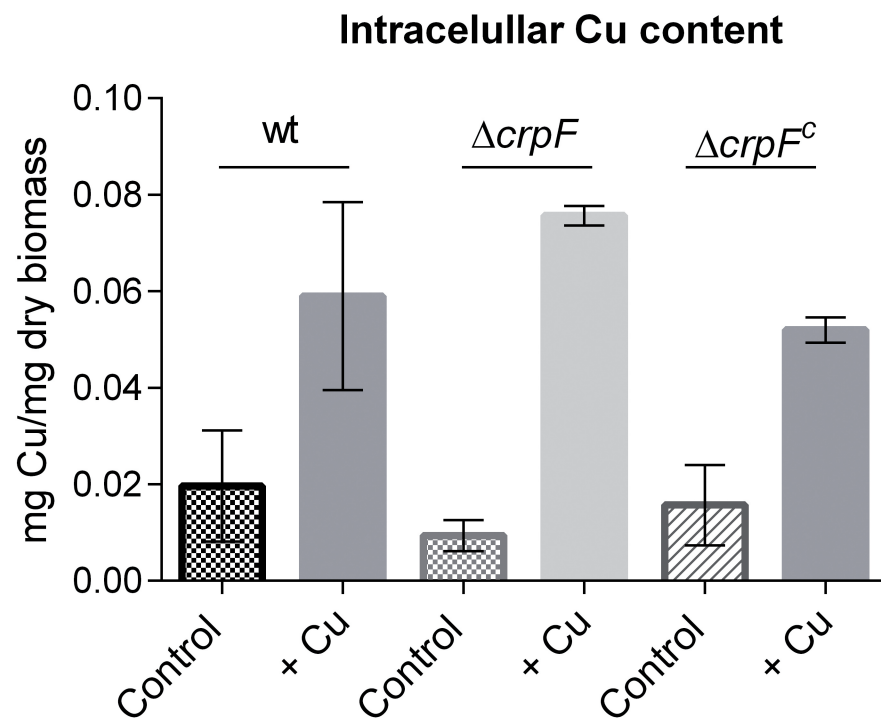


Figure 5

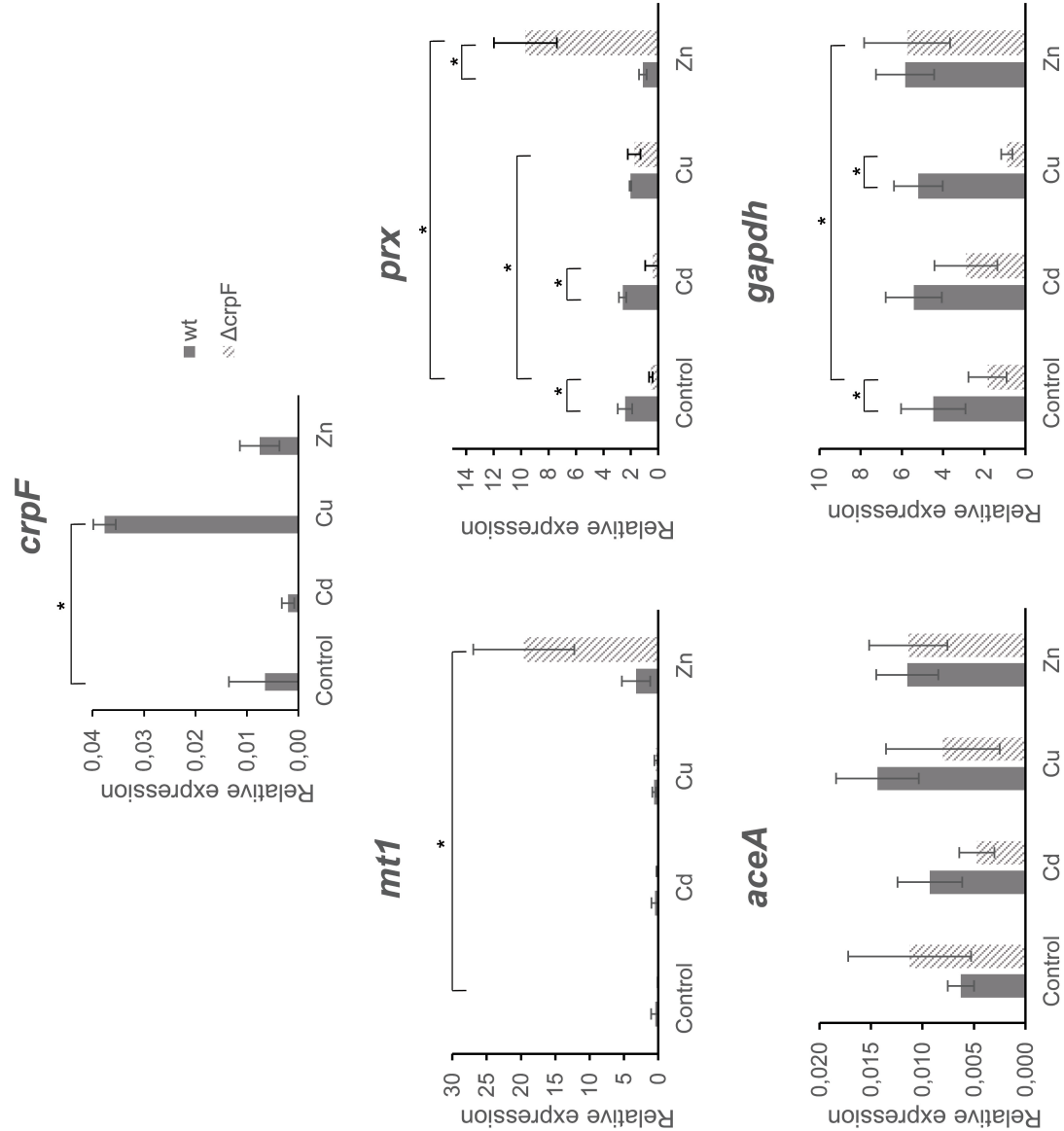
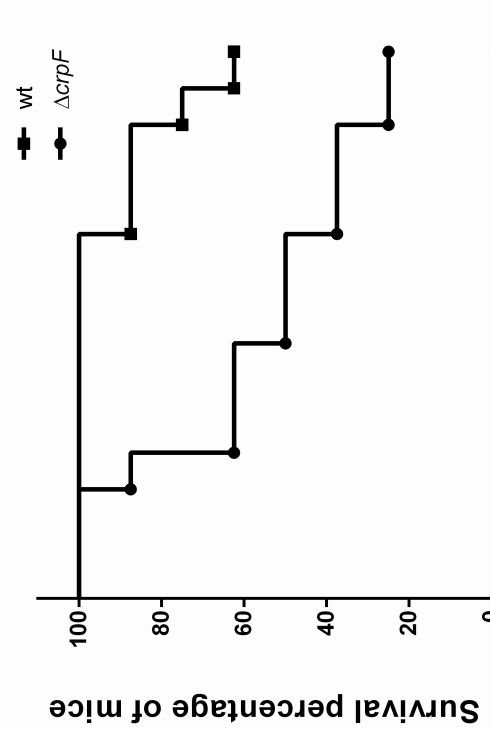
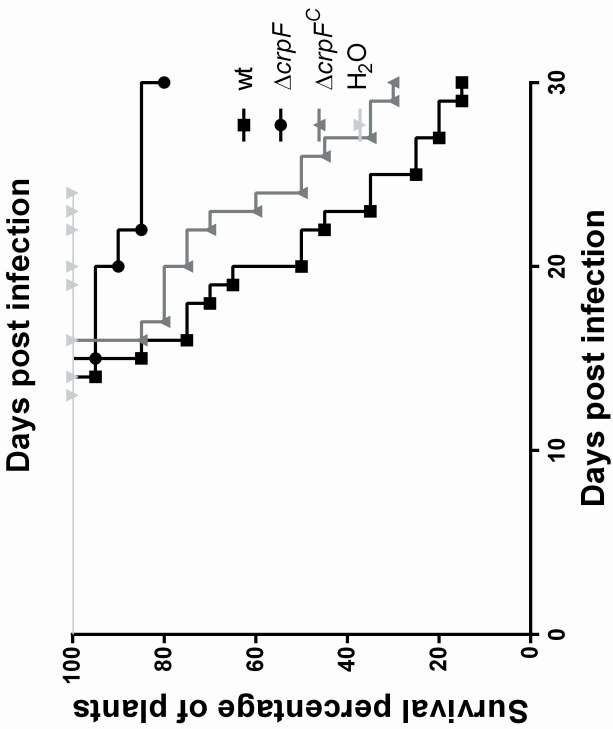


Figure 6

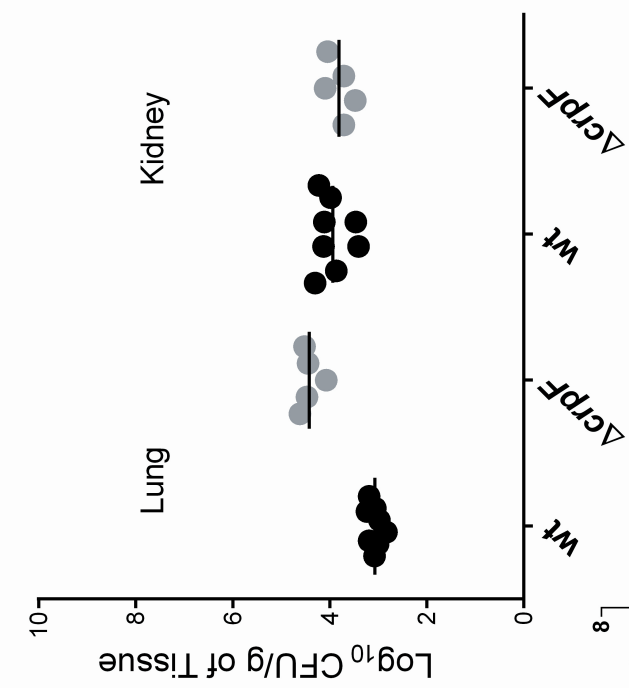
A



C



B



D

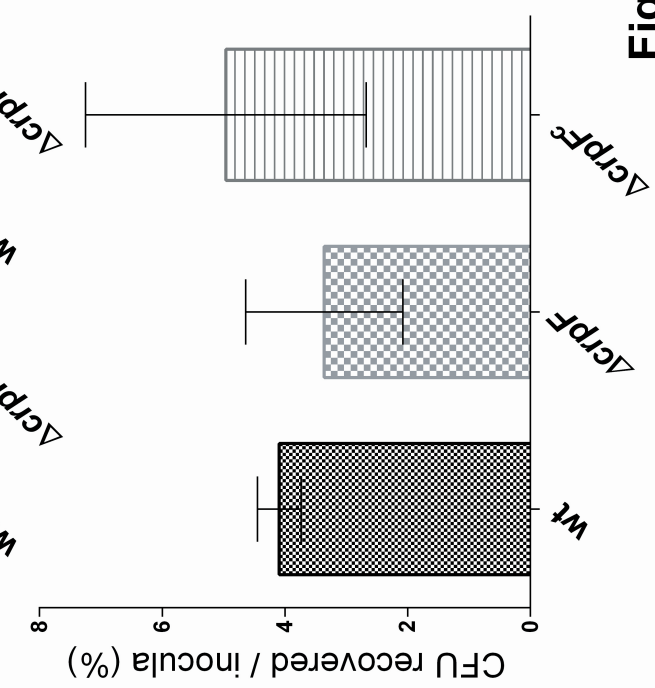


Figure 7

A

CdCl ₂				CuSO ₄				ZnCl ₂			
0.1 mM	0.15 mM	0.25 mM	0.3 mM	0.3 mM	0.4 mM	1 mM	1.5 mM	15 mM	20 mM	25 mM	30 mM



B

MIC of heavy metals (mM)			
Strains	CdCl ₂	CuSO ₄	ZnCl ₂
wt	0.3	1.5	30
ΔcrpF	0.25	0.4	20

Supplementary Figure 1. A) Effect of different concentration of heavy metals on wt and mutant strains growth in 96-wells plates . 30 μ l of a 10^6 spores mL^{-1} suspension were inoculated in the wells containing synthetic media (SM) supplemented with different concentrations of CdCl₂, CuSO₄ and ZnCl₂. **B)** Minimal inhibitory concentrations (MIC) of heavy metals for wt and mutant strains of *F. oxysporum*.

Relevant Copper-Binding Proteins							
Copper Transporters							
ID	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>N. crassa</i>	<i>C. albicans</i>	Function
FOXG_03101		CtrA2 (AfuA_6G02810) *	Ctr1p *	Ctr1 *	TCU-3 NCU07428	Ctr1 *	high-affinity copper transporter
FOXG_07770/ FOXG_01107		CtrC (AfuA_2G03730) *	Ctr3p *	Ctr4 *	TCU-1 NCU00830	Ctr4	high-affinity copper transporter
FOXG_01748		Ctr2 (AfuA_3G08180)	Ctr2p	Ctr2 *	TCU-2 NCU03281	Ctr2	low-affinity copper transporter
FOXG_11217		CtrA1 (AfuA_3G13660)	Ctr1p *	---	---	---	unknown function
FOXG_03265 *		CrpA (AfuA_3G12740) *	---	---	Copper resistance-associated P-type ATPase NCU04076	Ccc2 * Crp1 *	intracellular copper ATPase copper-exporting ATPase

Supplementary Table 1. Relevant copper transporters in *F. oxysporum*. Sequence similarity searches with the BLASTp tool were performed at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and the *F. oxysporum* genome database (<https://genome.jgi.doe.gov/Fusox1/Fusox1.home.html>) to find the orthologous genes in *F. oxysporum*. The mutant strains generated in these genes are indicated (*) and highlighted in blue are represented the genes which are involved in virulence.

5.3. Metal binding preferences of *Fusarium oxysporum* metallothionein FoxyMT1 and its subcellular localization

Damaris Lorenzo-Gutiérrez^a, Alejandro Catalán^b, Loida López-Fernández^a, Josep Guarro^a, Javier Capilla^a and Òscar Palacios^c

^aUnidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, e Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV), Universidad Rovira y Virgili, Reus, Tarragona, Spain; ^bLaboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, 1270300 Antofagasta, Chile; ^cDepartament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

(En preparación)

**Metal binding preferences of *Fusarium oxysporum* metallothionein
FoxyMT1 and its subcellular localization**

Damaris Lorenzo-Gutiérrez ^a, Alejandro Catalán^b, Loida López-Fernández^a, Josep
Guarro^a, Javier Capilla^a and Òscar Palacios^c

^a Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, e Instituto de
Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV), Universidad Rovira y Virgili, Reus, Tarragona, Spain

^b Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Tecnología Médica, Facultad de
Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta, 1270300 Antofagasta, Chile

^c Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-
Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

*Corresponding authors:

Javier Capilla: javier.capilla@urv.cat

Òscar Palacios: oscar.palacios@uab.cat

Abstract

FoxyMT1 has been identified as the unique hypothetical metallothionein (MT) present in the whole genome of *Fusarium oxysporum*. MTs are known as intracellular proteins but very few studies have been done regarding their subcellular location, none of them in fungi. Additionally, previously expression analysis of *mt1* showed that Zn specifically activates this gene. In this study, with the aim to characterize the subcellular localization and metal-binding abilities, the FoxyMT1 corresponding cDNA was cloned and functionally expressed in presence of Cd, Cu and Zn. FoxyMT1 was localized predominantly in endoplasmic reticulum as determined by immunodetection techniques using mouse polyclonal anti-rFoxyMT1 sera. Also, the recombinant FoxyMT1 protein was characterized by electrospray mass spectrometry (ESI-MS) and ICP-AES, showing a high specificity towards divalent metal ions, especially Zn^{2+} , which led us to classified FoxyMT1 as a Zn-thionein. All this results suggest a putative Zn-regulating/Zn-homeostatic function of this particular metalloprotein in this organism.

Introduction

Metallothioneins (MT) belong to the superfamily of metalloproteins that are found in most of living organisms including prokaryotes, fungi, plants or mammals¹, and functionally related to the homeostasis of heavy metals, metal detoxification, and free radical scavenging², mainly due to their exceptional high cysteine (Cys) content. MTs can regulate the homeostasis of physiological heavy metals, mainly zinc (Zn) and copper (Cu)³. Although MTs show high diversity in size and amino acid sequences among organisms, they are characterized by containing cysteine-rich highly conserved motifs that have allowed to classify MTs depending on the number and distribution of their Cys residues¹. Also, a functional classification has been recently proposed for MTs, related with their binding preferences for monovalent metal ions (Cu-thioneins), for divalent metal ions (Zn-thioneins) or with no particular binding preferences⁴.

Several evidences suggest that metal specificity of MTs is conferred by the inherent properties of the proteins, not only the Cys composition. For instance, the mammalian *Mus musculus* MT1 isoform preferentially binds divalent metal ions Zn(II) or Cd(II)⁵, while yeast CUP1 is selective for monovalent metal ions such as Cu(I) or Ag(I)⁶. Furthermore, two pulmonate snail metallothionein isoforms has been discovered which, despite having an identical number and disposition of Cys residues, they seem to have Cu⁺ or Cd²⁺ selective character and each of one is involved in strictly Cu or Cd regulation functions⁷.

Subcellular location of MTs seems to be dependent of metal presence into cell⁸⁻¹⁰. A number of studies support a role for Zn transfer from MTs to other metalloproteins including Zn-dependent transcription factors¹¹⁻¹³. Thereby, MTs under transcriptional regulation of factor MTF-1 (Zn-sensing metal-response element-binding transcription factor-1), mobilize Zn into the nucleus, mitochondria, Golgi apparatus (GA), lysosomes, endoplasmic reticulum (ER), cytosol, and, possibly, zincosomes^{9, 14-18}. How MTs achieve this feat in intracellular compartments with diverse Zn demands is not clear since their amino acid sequence lacks signals that dictate localization to specific organelles. Also, the 3' untranslated region of MT1 mRNA (an MT isoform present in humans) signals transcript localization to the perinuclear region, arming the ability of MT1

protein to gain entry into the nucleus¹⁹. Zn availability must be tightly regulated in the nucleus to mediate Zn binding/release by gene-inducer and repressor molecules and prevent oxidative DNA damage^{20, 21}. The finding that MT resides in the nucleus raises questions about its contribution to nuclear functions such as gene regulation and provides clues to its crucial influence in regulating the size of nuclear Zn pool. Moreover, although MT are cytosolic proteins in resting cells, they can be translocated transiently to the cell nucleus during cell proliferation and differentiation; for instance, in carcinogenesis processes²².

Another mechanism proposed for MT cellular compartmentalization is protein-protein interaction. Associations between MTs and peptides or small molecules enable MT targeting to the extracellular milieu^{3, 23, 24}. Indeed, MTs have been detected outside cells²³; whether they are actively secreted or passively released as a result of compromised membrane integrity is unclear. Mounting evidences point to an active involvement of MTs in modulating extracellular heavy metals²⁵⁻²⁷. However, it is not known if cells export MTs in their apo-form or as Zn/Cu-MT complexes.

We have recently reported and characterized the first MT from a filamentous fungus of interest for human health, *Fusarium oxysporum*, MT1 (FoxyMT1)²⁸. FoxyMT1 seems to be the unique hypothetical metallothionein in the whole *F. oxysporum* genome, and it showed to be different to previous documented MTs from fungi, such as the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*, which presents two long MT isoforms, CnMT1 and CnMT2²⁹. Indeed, both CnMTs isoforms were recognized as genuine copper-thioneins and were identified a set of Cu₅-core clusters in MTs and, interestingly, they both were the responsible of resistance of the organism to macrophage attack. As *C. neoformans* MTs, FoxyMT1 does not present the typical short amino acid sequence of MTs, since it is a 111-residue long polypeptide but has conserved cysteine motifs and multiple sequence motifs related to metal response in its promoter sequence²⁸.

In aim to contribute to the knowledge of these metalloproteins in fungi, the purpose of the present study was to determine the subcellular localization and the metal binding abilities of the MT1 of *F. oxysporum* (FoxyMT1).

Materials and methods

Fungal strains and culture conditions

F. oxysporum wild type strain 4287 was used in all experiments. The fungus was stored at -80 °C as a microconidial suspension with 30% glycerol. Mycelium for RNA extraction was obtained from potato dextrose broth (PDB) cultures with shaking at 170 rpm for 3–4 days at 28 °C as previously described³⁰.

For subcellular fractionation, freshly obtained microconidia were germinated in PDB at 28 °C and 170 rpm for 12 h, and then transferred to synthetic media (SM)²⁸ without metals (control) or supplemented with 7.5 mM ZnCl₂ and incubated for 6 h. After incubation, the mycelium was harvested by filtration, washed with distilled water, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until its use for RNA extraction.

FoxyMT1 cloning

The nucleotide sequence FOXG_02862 from *F. oxysporum* coding for hypothetical protein MT1 and available in MycoCosm portal³¹ of the Joint Genome Institute (JGI) and on NCBI GeneBank as Access N° XM_018380332 was used for expression of their ORFs in *E. coli* BL21 DE3 and purified as fusion proteins with a N-terminal 6-His tag. For this, first, total RNA from *F. oxysporum* strain 4287 ground mycelium was extracted in liquid nitrogen with a mortar and pestle and by using TRIzol™ reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as previously described^{32, 33}. Total RNA was resuspended in DNase/RNase-free double distilled water and their quality was determined by electrophoresis of RNA on agarose-formaldehyde gel as previously described³⁴ and RedSafe-stained, and also their purity was analyzed in a Nanodrop 2000t spectrophotometer (Thermo Fisher). Total RNA (1 µg) treated with DNase I (Thermo Fisher) was reverse-transcribed into first-strand complemented DNA (cDNA) with an iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) using a poly-dT antisense primer, according to the manufacturer's instructions.

Amplification of *mt1* was performed from cDNA using specific primers **mt1.14** 5'-ATGGTCGTCAACACTCCCG-3' (forward) (containing the start codon ATG) and **mt1.15** 5'-TTATTTCTTGGTAGTAAAGTCG-3' (reverse) (containing the stop codon) designed on Oligo 7 software (Molecular Biology Insights, Inc., Colorado Springs, CO, USA). Endpoint PCR was performed with 2.5 U of BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline, London, UK) in a 50 µl final reaction volume, containing 300 nM of each mt1.14 and mt1.15 primers, 1x NH₄ reaction buffer, 1 mM of each dNTP, 3 mM MgCl₂ and 1 µl of cDNA, according to the following conditions: 95 °C for 5 min, 30 cycles of 35 s at 94 °C, 30 s at 58 °C and 30 s at 72 °C, followed by a final elongation of 7 min at 72 °C. The PCR products were visualized by electrophoresis on 1.5% RedSafe-stained agarose gel.

The amplified cDNA was cloned in the vector pGEM-T using pGEM®-T Vector System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) kit following fabricant instructions and transformed in *E. coli* NovaBlue Singles™ Competent cells (Novagen, Madison, WI, USA). The white colonies of transformants were selected by adding X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) in plates of LB medium containing 100 µg/mL ampicillin. The plasmids of randomly chosen clones were purified by mini-prep and sequenced³⁴.

Expression and Purification of Recombinant FoxyMT1 Protein (rFoxyMT1)

The plasmids (50 ng) of the clones with cDNA that coded for the FoxyMT1 were amplified by PCR in a 20 µL final reaction volume using 2 U of the enzyme Platinum™ *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen), and containing 1x *Pfx* Amplification buffer, 300 nM of each mt1.14 and mt1.15 primers, 0.2 mM of each dNTP, and 1.5 mM MgSO₄. PCR reaction was performed at following conditions, 95 °C for 3 min, 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 58 °C and 90 s at 72 °C, followed by a final elongation of 7 min at 72 °C. An additional amplification step of 10 min at 72 °C with *Taq* DNA polymerase was performed to add 3' A-overhangs at the amplification product. The PCR products were separated in a 0.8% agarose gel and purified using Zymoclean™ Gel DNA recovery kit (Zymo Research Corp, Irvine, CA, U.S.A.) following fabricant instructions. Then the amplification products were subcloned in the pET-SUMO vector (Invitrogen) and were transformed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. Clones expressing the recombinant

protein (rFoxyMT1) were confirmed by pilot expression using isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) as inducer. Also, the correct ORF orientation of rFoxyMT1 sequence was confirmed by sequencing of clones using the SUMO Forward Sequencing and the T7 Reverse Sequencing primers at Macrogen Europe (Macrogen, Inc., Amsterdam, The Netherlands). The consensus sequences were obtained using SeqMan software, version 7.0.0 (DNASTar Lasergene, Madison, WI, USA) and the protein product deduced from the sequence was compared with the sequences in the databank of NCBI using the BLASTp tool³⁵.

The selected clone with recombinant construct pET-SUMO-FoxyMT1 was inoculated in LB broth containing 50 μ g/mL kanamycin (LB-Kan), incubated at 37 °C overnight. Then overnight cultures were diluted 1:50 in 100 mL LB-Kan and incubated at 37 °C with constant agitation until an A₆₀₀ \approx 0.3 was reached. The expression of the recombinant proteins was induced by adding 0.3 mM IPTG and incubated at 25 °C with vigorous agitation (250 rpm) for 7 h. Cells were then centrifuged at 4000 g for 15 min, and the pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM KH₂PO₄ pH 7.8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 1 mg/ml lysozyme). Cell suspensions were lysed by six cycles of sonication of 10 s each at low intensity. Lysates were centrifuged at 20,000 g for 20 min and then rFoxyMT1 was purified in native conditions from the supernatants using Ni-NTA Agarose resin (Ni-NTA Purification System; Invitrogen). First, the resin was washed with ddH₂O and equilibrated with binding buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Then, the resin with the cell lysates were incubated for an hour in orbital agitation on ice and centrifuged at 800 g for 1 min at 4 °C. Then the supernatant was discarded and the resin was washed three times with wash buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole). The recombinant protein was eluted with elution buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl and 250 mM imidazole) by orbital incubation for 30 min at 4 °C. The elution buffer was changed to PBS using an amicon ultra-15 tube with a cut-off of 3 kDa and analysed by SDS-PAGE. The protein concentration was determined by the method of Coomassie blue (BioRad, Hercules, CA) described by Bradford³⁶ and stored at -80 °C.

Antibodies

Polyclonal sera against the recombinant protein FoxyMT1 was obtained by immunization of mice with the rFoxyMT1, approximately 10 µg/immunization and the last one with an overloaded dose (20 µg). It was carried out one immunization per week for 4 weeks. The immunization took place the same day and at the same hour approximately every week. We used TiterMax® Gold adjuvant for all immunizations. IgGs were purified from serum. IgG antimouse antibodies were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Immunoblotting

Recombinant protein rFoxyMT1 (5 µg) was submitted at 12%-gel SDS-PAGE electrophoresis under non-reducing conditions³⁷. Gels were stained with Coomassie brilliant blue G-250 or transferred to a nitrocellulose membrane. After transfer, the membranes were blocked with TBS/0.1% Tween 20 (TBS-T) with 5% (w/v) BSA for 1 h and incubated with mouse polyclonal anti-rFoxyMT1 serum (dilution 1:1000) ON at 4 °C. Pre-immune mouse serum (1:1000 dilution) was used as the negative control and as positive control, mouse anti-His tag antibody (1:1000 dilution) was used. Membranes were washed six times for 10 min each time with TBS-T and incubated with Goat anti-Mouse IgG (H+L)-HRP antibody (dilution 1:30,000) in TBS-T for 1 h at room temperature. After another six washes with TBS-T, membranes were developed by ECL using the SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific). ECL images were captured in a ChemiDoc Imaging System (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) using Image Lab software.

Subcellular fractionation

Several fractions were isolated from fungal mycelia by ultracentrifugation on discontinuous sucrose gradients as previously described³⁸ with some modifications. Cells were thoroughly washed with water, disrupted by freezing liquid nitrogen and resuspended in 1 mL ice-cold HM buffer³⁹ containing 10 mM

HEPES, 1 mM MgCl₂ pH 7.5, 1 mM PMSF and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma). The cell homogenate was centrifuged at 1,000 *g* during 5 min at 4 °C to remove un-lysed cells. The supernatant was recovered and centrifuged at 10,000 *g* during 10 min at 4 °C to generate a pellet, corresponding to endoplasmic reticulum enriched fraction (P10), which was resuspended in 350 µL icecold-HM buffer and stored at -20 °C for further analyses. The supernatant (S10) was loaded on a 4 mL sucrose step gradient (26 to 54%). Sucrose solutions were prepared in HM buffer and the gradient column was incubated over night at 4 °C before use. Gradient was centrifuged at 160,000 *g* for 90 min at 4 °C using a SW50.1 swinging bucket rotor in a Beckman ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA). After centrifugation, 14 fractions of 350 µL each were collected from the top of the gradient. The fractions were stored at -80 °C, and the remaining pellet (P160) was resuspended in 350 µL ice-cold HM and stored at -20 °C for further analyses. Sucrose concentration of each fraction was measured using a refractometer (Atago Co., LTD). Aliquots of each fraction were mixed with SDS sample buffer and proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by immunoblotting using the anti-rFoxyMT1.

***In vitro*-formed metal-rFoxyMT1 complexes**

BL21 (DE3) *E. coli* clone with pET-SUMO-FoxyMT1 was culture in 3-L of LB broth and rFoxyMT1 was expressed in presence or absence of metals to analyze metal-MT complexes formed. Thus, FoxyMT1 induction was switched on with 0.3 mM of IPTG 30 min before the addition of the suitable metal supplement (300 µM ZnCl₂, 300 µM CdCl₂ or 500 µM CuSO₄, final concentrations) to allow the synthesis of the corresponding metal complex. Additionally, productions without metal supplementation after induction were carried out. The cultures were grown for 7 h. Argon was bubbled in all the subsequent steps of the purification protocol to prevent oxidation of the metal–MT complexes. The cultures were centrifuged at 20 000 *g* and the recovered cell mass was resuspended in lysis buffer (50 mM potassium phosphate, pH 7.8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 10 mM imidazole) disrupted by sonication and rFoxyMT1 was purified as explained above. Before elution step, the N-terminal tag (6-His-SUMO) was digested with SUMO protease (20 U per mg of fusion protein, 2 h at

30 °C) to separate the metal-MT complexes from the tag of the fusion protein, which remains bound to the resin. The recovered solution was concentrated using an amicon ultra-0.5 tube with a cut-off of 3 kDa and analyzed by SDS-PAGE.

Spectroscopic characterization of the metal- FoxyMT1 complexes

Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) for protein quantification and element composition (S, Zn, Cd and Cu) of metal-rFoxyMT1 complexes were analyzed on a Polyscan 61E spectrometer (Thermo Jarrell Ash Corporation, Franklin, MA, USA) at appropriate wavelengths (S, 182.040 nm; Zn, 213.856 nm; Cd, 228.802 nm; Cu, 324.803 nm) under conventional (dilution with 2% HNO₃ (v/v)) conditions. rFoxyMT1 concentrations in the preparations were calculated from sulfur measurements, assuming the only contribution to their S content was that made by the rFoxyMT1 peptides.

ElectroSpray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses of the metal MT complexes

Molecular weight (MW) determinations were performed by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF MS) on a Micro Tof-Q instrument (Bruker) interfaced with a Series 1200 HPLC Agilent pump, equipped with an autosampler, all of which were controlled by the Compass Software. Calibration was attained with ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies). Samples containing MT complexes were analyzed at 40 µL min⁻¹ flow rate, in a spectra collection range 800-2500 m/z. The carrier buffer was a 5:95 mixture of acetonitrile:ammonium acetate/ammonia (15 mM, pH 7.0). For the analysis at acidic pH the carrier liquid was a 95:5 mixture of formic acid aqueous solution and acetonitrile at pH 2.4.

Results and Discussion

Cloning and expression of recombinant *Fusarium oxysporum* metallothionein

Previously *in silico* searching for putative metallothioneins in the *F. oxysporum* genome database available in MycoCosm portal³¹ of the Joint Genome Institute (JGI)⁴⁰ led us to the identification of a single hypothetical uncharacterized protein sequence related to copper resistant proteins, which was called as *F. oxysporum* MT1 (FoxyMT1)²⁸. The 886 bp cDNA from mRNA of the *F. oxysporum* available on NCBI GenBank (Access N° XM_018380332) was analyzed for ORF searching founding a 336 bp single ORF, coding for a 111 amino acids peptide (Figure 1a). Theoretical protein was of 11.242 Da and pI of 7.86. Also, analysis of the peptide sequences did not find N-glycosylation sites and not present a peptide signal. This ORF was used as sequence for PCR primers design, which were used to amplify and cloned the 336 bp sequence of FoxyMT1 from *F. oxysporum* strain 4287 mycelium. The cloning sequence was subcloned on expression vector, and FoxyMT1 protein (11.24 kDa) was expressed and purified as a fusion protein with a N-terminal 6His-SUMO tag (16 kDa) showing a MW of ~27 kDa on SDS-PAGE gels (Figure 1b). Digestion of fusion protein with SUMO protease, showed the estimated MW of rFoxyMT1 and 6-His-SUMO tag (Figure 1c). Also, polyclonal antibodies produced against recombinant FoxyMT1 recognized the fusion protein (Figure 1d).

Subcellular localization of FoxyMT1

Western blot analyses of *F. oxysporum* fractions using polyclonal antibodies against the recombinant protein rFoxyMT1 confirmed the location of FoxyMT1 in the endoplasmic reticulum and the plasma membrane (P10), as well as in the first six first fractions corresponding to cytosol, Golgi apparatus and ribosomes and polyribosomes (S1-S6). Although the band was more intense in the fraction S1 versus S2-S5. rFoxyMT1 was not present in the last fractions S7-S15 neither in the P160.

A very few studies about fungal MTs localization have been done. In one of them, the Mmt1 of *Magnaporthe grisea* has been subcellular localized during plant

infection. Mmt1 was localized at the cell periphery of hyphae, in the appressorium cell wall, and in the cell wall of germ tube tips before appressorium development⁴¹. In another study, the subcellular distribution of Cmt1 and Cmt2 from *C. neoformans* was determined in cells cultured *in vitro* at the cell periphery⁴².

Surprisingly, immunoblot for fractions detect a protein band the double of the molecular weight estimated for FoxyMT1. We hypothesize that this may due to a protein dimerization or protein complex formation. Indeed, Mmt1 (2,64 kDa) was inferred as part of a larger multiprotein complex, when anti-Mmt1 antibody reacted specifically with 26-kDa protein band in protein extracts from hyphae of *M. grisea*⁴¹. Also, the MTs dimerization has been documented in metallothioneins submitted to oxidative stress⁴³. The physiological significance of oxidative dimerization of MTs is unclear. Nevertheless, several studies have detected *in vivo* oxidative MT dimers after animals were exposed to high levels of toxic metals^{44, 45}.

Zn-, Cd- and Cu-binding abilities of rFoxyMT1

The *mt1* cDNA constructed by site-directed mutagenesis according to the standard genetic code was confirmed by DNA sequencing. SDS-PAGE analyses of the total protein extract from BL21 cells transformed with pET SUMO plasmid revealed the presence of bands corresponding to the expected 6His-SUMO-MT size (data not shown). Homogeneous metal-MT complex preparations were obtained from 3-l *E. coli* cultures at final concentrations varying in the 10⁻⁴ M range, as detailed in Table 1. The samples were analyzed in two different pH values (pH 7.0 and 2.4) and in different conditions in order to assure that the analysis does not provoke any alterations in the samples. From standard conditions of MT analysis, the recorded data were the whole time the same.

Firstly, Zn-MT and Cd-MT aliquots were acidified to pH 2.4 to verify the molecular weight of the corresponding apo-forms, since the acid pH conventionally results in demetalation of the complexes formed by MTs and divalent metal ions⁴⁶. For rFoxyMT1, the molecular mass of the acidified samples was in accordance with the expected value calculated from its respective amino acid sequence (Fig. 3).

The different productions have been analyzed at neutral pH (Fig. 4), under experimental conditions that allow the protein to maintain its coordinated metallic cations unchanged. The productions without metal supplementation allowed to observe the presence of metallic species with low Zn content (Zn₁- to Zn₄-rFoxyMT1) as well as apo-rFoxyMT1, which can be explained by the partial oxidation of the cysteines (which impairs the metal binding). However, the production in a Zn supplemented medium leads to the formation of two metallated species, Zn₄- and Zn₅-rFoxyMT1.

On the other hand, the production in a Cd supplemented medium rendered the formation of several Cd species (Cd₅- and Cd₆-rFoxyMT1) together with a mixed species, Cd₅Zn₁-rFoxyMT1. Significantly, the presence of this mixed species, containing Zn even in a Cd-supplemented medium, is indicative of a strong Zn-thionein character¹.

The production in copper media has been the only one that contains the demetallated (apo-protein) species, in this case showing a high degree of oxidation (up to 12 Cys oxidized).

When measuring the protein concentration in each preparation, as well as their metallic content, by ICP-AES (Table 1), the results obtained fully matched those observed by ESI-MS. Those preparations without metal supplementation rendered mainly Zn-species (with Zn content depending on the preparation), even with lower concentration than the other preparations. As expected, the Zn-preparation rendered Zn-species, as well as Cd-preparations allowed the obtaining of Cd-species. The Cu-preparation rendered a very low Cu content which is in accordance with the presence of only oxidized apo-MT at the ESI-MS spectrum.

Overall, results obtained by ESI-MS and ICP-AES measurements were fully in accordance to gene induction criteria, thus allowing the classification of FoxyMT1 as a clear Zn-thionein. This Zn-thionein character of FoxyMT1 resembles one mouse metallothionein isoform (mMT1)⁴⁷. The FoxyMT1 high ability to form complexes with divalent metal ions (Zn²⁺) means that these complexes are well folded and remain steady in physiological conditions.

Conclusions

Taking into account all the results obtained in the different experiments, as well as those previously described²⁸, it can be concluded that, on the one hand, the immunodetection techniques allowed the localization of FoxyMT1 in the plasma membrane and the reticulum endoplasmic. On the other hand, the expression analysis pattern of *mt1* cDNA and the analysis of metal binding abilities of the recombinant protein (rFoxyMT1) allow to clearly classify FoxyMT1 as a Zn-thionein, thus suggesting a function related with Zn-homeostasis.

References

1. M. Capdevila, R. Bofilla, O. Palacios and S. Atrian, State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 46– 62.
2. M. Capdevila and S. Atrian, Metallothionein protein evolution: a miniassay, *J Biol Inorg Chem*, 2011, **16**, 977-989.
3. K. Subramanian Vignesh and G. S. Deepe, Jr., Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection, *International journal of molecular sciences*, 2017, **18**.
4. A. Ziller and L. Fraissinet-Tachet, Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein, *Metallomics*, 2018, **10**, 1549-1559.
5. E. Artells, O. Palacios, M. Capdevila and S. Atrian, Mammalian MT1 and MT2 metallothioneins differ in their metal binding abilities, *Metallomics*, 2013, **5**, 1397-1410.
6. D. R. Winge, K. B. Nielson, W. R. Gray and D. H. Hamer, Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties, *The Journal of biological chemistry*, 1985, **260**, 14464-14470.
7. O. Palacios, A. Pagani, S. Perez-Rafael, M. Egg, M. Hockner, A. Brandstatter, M. Capdevila, S. Atrian and R. Dallinger, Shaping mechanisms of metal specificity in a family of metazoan metallothioneins: evolutionary differentiation of mollusc metallothioneins, *BMC biology*, 2011, **9**, 4.
8. R. J. Stockert, A. G. Morell and I. Sternlieb, Purification of canine hepatic lysosomal copper-metallothionein, *Methods in enzymology*, 1991, **205**, 286-291.
9. M. G. Cherian and M. D. Apostolova, Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation, *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 2000, **46**, 347-356.
10. E. Atrian-Blasco, A. Santoro, D. L. Pountney, G. Meloni, C. Hureau and P. Faller, Chemistry of mammalian metallothioneins and their interaction with

amyloidogenic peptides and proteins, *Chemical Society reviews*, 2018, **46**, 7683-7693.

11. W. Feng, J. Cai, W. M. Pierce, R. B. Franklin, W. Maret, F. W. Benz and Y. J. Kang, Metallothionein transfers zinc to mitochondrial aconitase through a direct interaction in mouse hearts, *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, **332**, 853-858.
12. L. J. Jiang, W. Maret and B. L. Vallee, The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**, 3483-3488.
13. G. Roesijadi, R. Bogumil, M. Vasak and J. H. Kagi, Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair, *The Journal of biological chemistry*, 1998, **273**, 17425-17432.
14. B. Ye, W. Maret and B. L. Vallee, Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**, 2317-2322.
15. K. Subramanian Vignesh, J. A. Landero Figueroa, A. Porollo, J. A. Caruso and G. S. Deepe, Jr., Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival, *Immunity*, 2013, **39**, 697-710.
16. S. J. Lee and J. Y. Koh, Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes, *Molecular brain*, 2010, **3**, 30.
17. Y. Qin, P. J. Dittmer, J. G. Park, K. B. Jansen and A. E. Palmer, Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn²⁺ with genetically encoded sensors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**, 7351-7356.
18. G. Wellenreuther, M. Cianci, R. Tucoulou, W. Meyer-Klaucke and H. Haase, The ligand environment of zinc stored in vesicles, *Biochemical and biophysical research communications*, 2009, **380**, 198-203.
19. M. Levadoux, C. Mahon, J. H. Beattie, H. M. Wallace and J. E. Hesketh, Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with

the perinuclear cytoskeleton, *The Journal of biological chemistry*, 1999, **274**, 34961-34966.

20. R. J. Cousins, A role of zinc in the regulation of gene expression, *The Proceedings of the Nutrition Society*, 1998, **57**, 307-311.
21. Y. Song, S. W. Leonard, M. G. Traber and E. Ho, Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats, *The Journal of nutrition*, 2009, **139**, 1626-1631.
22. M. G. Cherian, A. Jayasurya and B. H. Bay, Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis, *Mutation research*, 2003, **533**, 201-209.
23. M. A. Lynes, K. Zaffuto, D. W. Unfricht, G. Marusov, J. S. Samson and X. Yin, The physiological roles of extracellular metallothionein, *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)*, 2006, **231**, 1548-1554.
24. I. El Ghazi, B. L. Martin and I. M. Armitage, New proteins found interacting with brain metallothionein-3 are linked to secretion, *International journal of Alzheimer's disease*, 2010, **2011**, 208634.
25. J. Youn, L. A. Borghesi, E. A. Olson and M. A. Lynes, Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. II. Effects on macrophage functions, *Journal of toxicology and environmental health*, 1995, **45**, 397-413.
26. M. A. Lynes, L. A. Borghesi, J. Youn and E. A. Olson, Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. I. Metallothionein effects on antibody production, *Toxicology*, 1993, **85**, 161-177.
27. M. A. Lynes, J. S. Garvey and D. A. Lawrence, Extracellular metallothionein effects on lymphocyte activities, *Molecular immunology*, 1990, **27**, 211-219.
28. D. Lorenzo-Gutierrez, L. Gomez-Gil, J. Guarro, M. I. G. Roncero, A. Fernandez-Bravo, J. Capilla and L. Lopez-Fernandez, Role of the *Fusarium oxysporum* metallothionein Mt1 in resistance to metal toxicity and virulence, *Metallomics*, 2019, **11**, 1230-1240.
29. O. Palacios, A. Espart, J. Espin, C. Ding, D. J. Thiele, S. Atrian and M. Capdevila, Full characterization of the Cu-, Zn-, and Cd-binding properties of CnMT1 and CnMT2, two metallothioneins of the pathogenic fungus

Cryptococcus neoformans acting as virulence factors, *Metallomics*, 2014, **6**, 279-291.

30. A. Di Pietro and M. I. Roncero, Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*, *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, **11**, 91-98.
31. I. V. Grigoriev, R. Nikitin, S. Haridas, A. Kuo, R. Ohm, R. Otilar, R. Riley, A. Salamov, X. Zhao, F. Korzeniewski, T. Smirnova, H. Nordberg, I. Dubchak and I. Shabalov, MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes, *Nucleic acids research*, 2014, **42**, D699-704.
32. P. Chomczynski and N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on, *Nature protocols*, 2006, **1**, 581-585.
33. S. M. Aljanabi and I. Martinez, Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Journal*, 1997, **25**, 4692-4693.
34. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, in *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, ed. J. Sambrook, Fritsh, E.F., Maniatis, T . New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. , 1989.
35. S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic acids research*, 1997, **25**, 3389-3402.
36. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 1976, **72**, 248-254.
37. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
38. A. Antebi and G. R. Fink, The yeast Ca⁽²⁺⁾-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution, *Molecular biology of the cell*, 1992, **3**, 633-654.
39. L. Lopez-Fernandez, C. Ruiz-Roldan, Y. Pareja-Jaime, A. Prieto, H. Khraiwesh and M. I. Roncero, The *Fusarium oxysporum* gnt2, encoding a

putative N-acetylglucosamine transferase, is involved in cell wall architecture and virulence, *PloS one*, 2013, **8**, e84690.

40. H. Nordberg, M. Cantor, S. Dusheyko, S. Hua, A. Poliakov, I. Shabalov, T. Smirnova, I. V. Grigoriev and I. Dubchak, The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates, *Nucleic acids research*, 2014, **42**, D26-31.

41. S. L. Tucker, C. R. Thornton, K. Tasker, C. Jacob, G. Giles, M. Egan and N. J. Talbot, A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*, *The Plant cell*, 2004, **16**, 1575-1588.

42. C. Ding, R. A. Festa, Y. L. Chen, A. Espart, O. Palacios, J. Espin, M. Capdevila, S. Atrian, J. Heitman and D. J. Thiele, *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence, *Cell host & microbe*, 2013, **13**, 265-276.

43. K. Zangger, G. Shen, G. Oz, J. D. Otvos and I. M. Armitage, Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the alpha-domain, *The Biochemical journal*, 2001, **359**, 353-360.

44. K. T. Suzuki and M. Yamamura, Isolation and characterization of metallothionein dimers, *Biochemical pharmacology*, 1980, **29**, 689-692.

45. K. T. Suzuki, R. Ohnuki and K. Yaguchi, Post-mortem and *in vitro* dimerization of metallothionein in cadmium-accumulated rat liver and kidney, *Toxicology letters*, 1983, **16**, 77-84.

46. A. Espart, M. Marin, S. Gil-Moreno, O. Palacios, F. Amaro, A. Martin-Gonzalez, J. C. Gutierrez, M. Capdevila and S. Atrian, Hints for metal-preference protein sequence determinants: different metal binding features of the five *Tetrahymena thermophila* metallothioneins, *International journal of biological sciences*, 2015, **11**, 456-471.

47. M. Capdevila, O. Palacios and S. Atrian, The Zn- or Cu-thionein character of a metallothionein determines its metal load when synthesized in physiological (metal-unsupplemented) conditions, *Bioinorganic chemistry and applications*, 2010, 541829.

Figures Legends

Figure 1. Expression and purification of recombinant protein FoxyMT1. A). nucleotide and deduced aminoacid sequence of metallothionein 1 of *F. oxysporum*. B). Expression and purification of rFoxyMT1 in *E.coli* BL21 (DE3) strain. Line 1: Molecular weight marker, Line 2: Pellet of lysed *E.coli* BL21 (DE3) without IPTG, Line 3: supernatant of lysed *E.coli* BL21 (DE3) without IPTG, Line 4: Pellet of lysed *E.coli* BL21 (DE3) induced with 0.3 mM of IPTG, Line 5: Supernatant of lysed *E.coli* BL21 (DE3) induced with 0.3 mM of IPTG, Line 6: Flowthrough of lysed cell supernatant incubated with Ni-NTA Agarose, Lines 7-9: washes, Line 10: Purified recombinant FoxyMT1. C). SUMO protease digestion of rFoxyMT1. Line 1: Molecular weight marker, Line 2: Fusion protein rFoxyMT1, Line 3: Digested FoxyMT1. D) Immunoblot for rFoxyMT1 detection.

Figure 2. FoxyMT1 localizes in plasma membrane and reticulum endoplasmic. Proteins contained within the indicated fractions were resolved by SDS-PAGE and detected by Western blotting analyses using Anti-rFoxyMT1 antibodies, as indicated. N: Negative control, fraction P10 incubated with PBS only. P10: endoplasmic reticulum enriched fraction. 1-15: fractions of ultracentrifugation in discontinuous sucrose gradient. P160: Pellet post ultracentrifugation.

Figure 3. Analysis of the apo-FoxyMT1 protein at acid pH. ESI-MS spectrum of the Zn- and Cd-MT preparations (same spectrum for both sets of samples), recorded at acidic pH (pH 2.4), showing the +10 charge state.

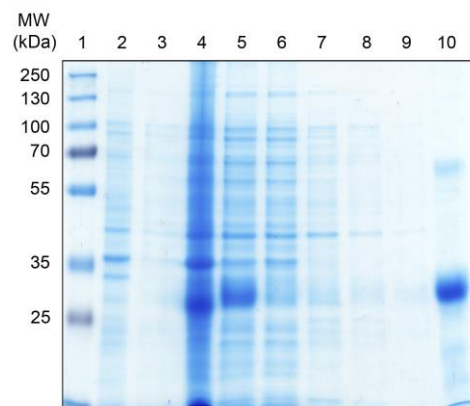
Figure 4. Analysis of the rFoxyMT1 preparations at neutral pH. ESI-MS spectra of the Cu- Zn- and Cd-MT preparations, as well as that without metal added after induction, recorded at neutral pH (pH 7.0), showing the +6 charge state.

Figures
Figure 1

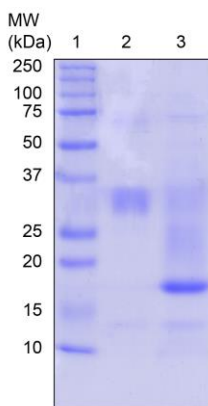
a

```
1 M V V N T P A T C C R S G D N V E C A C
1 ATGGTCGTCAACACTCCCGCTACCTGCTGCCGCTCTGGCGACAACGTCGAGTGCGCCTGT
21 A Q K A T C S C G Q K S A L Q C T C S K
61 GCTCAAAAGGCCACATGCTCATGCGGTCAAAAGTCCGCTCTCCAATGCACATGCTCCAAA
41 A A S E N T V N G P R C S C R A R P A G
121 GCCGCCTCCGAAAACACCGTCAACGGTCTCTGATGCTCATGCCGCGCTCGTCCCGCCGGT
61 E C T C D R A A T E N V T P T G S T C A
181 GAATGCACATGCGACCGCGCTACCGAGAAGCTTACACCAACTGGTTCAACTTGCCT
81 C G S R P A G G C T C E K A A D G G F N
241 TGCGGATCTCGTCCTGCTGGTGGCTGCAC TTGCGAGAAGGCTGCTGATGGTGGCTTTAAC
101 P A N E I D F T T K K *
301 CCTGCCAACGAGATCGACTTTACTACCAAGAAATAA
```

b



c



d

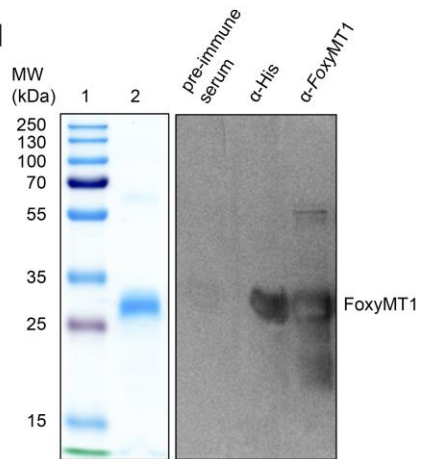


Figure 2

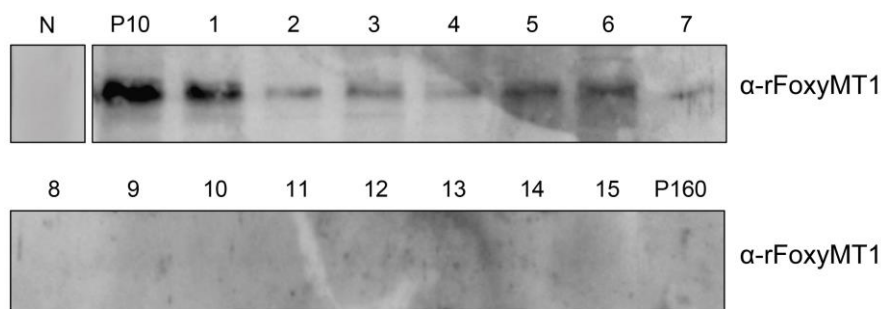


Figure 3

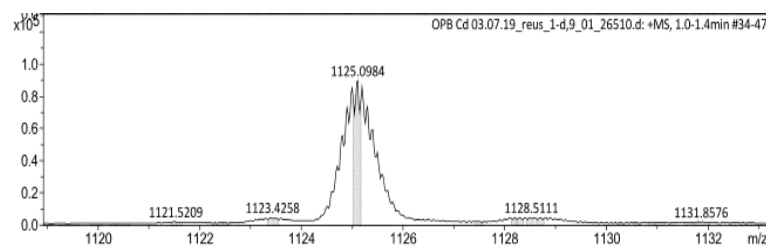


Figure 4

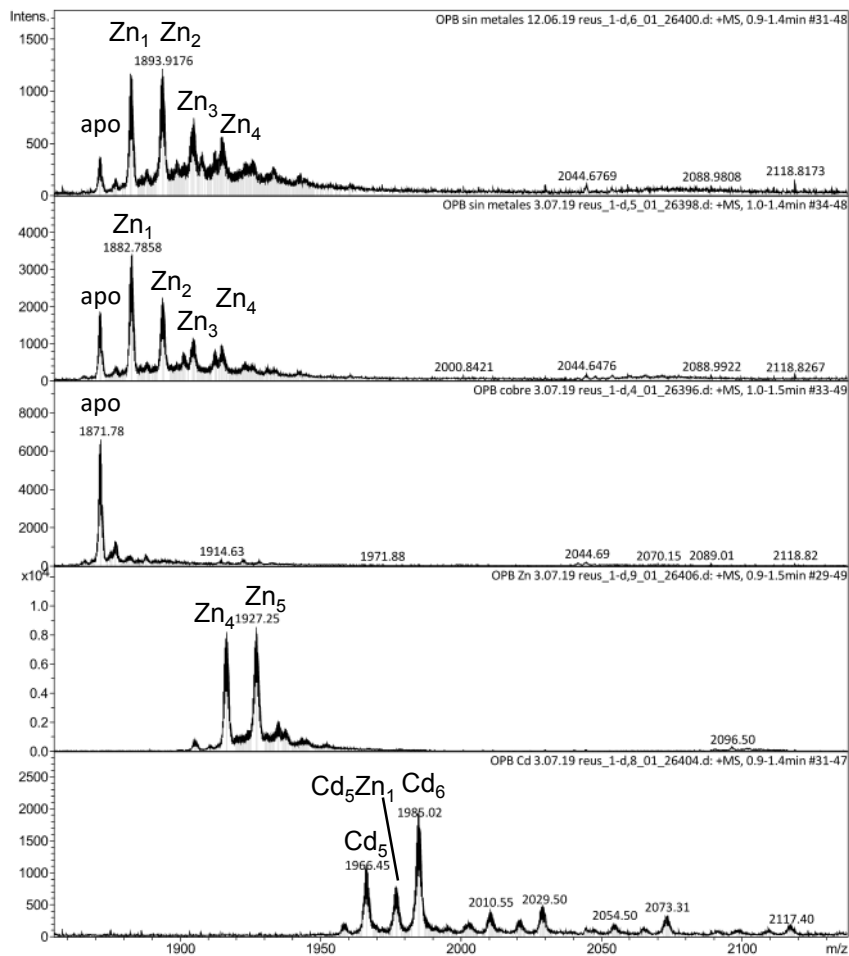
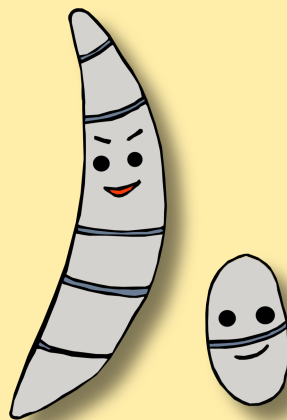
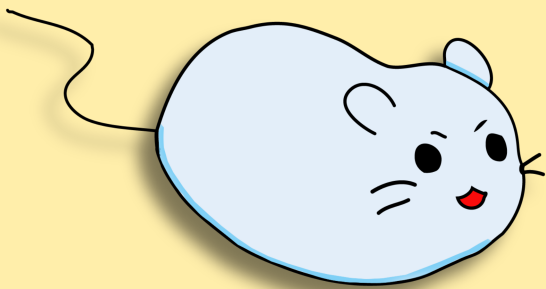


Table 1. ICP-AES results for the quantification of the proteins concentration and metal content of the different recombinant productions.

Metal supplemented	Protein conc. (M)	Molar ratios		
		Zn/prot	Cu/prot	Cd/prot
no metal	0.94 - 2.60 10 ⁻⁴	0.8 – 1.5	---	---
Cd ²⁺	7.59 10 ⁻⁴	---	---	3.3
Cu ²⁺	2.48 10 ⁻⁴	---	0.5	---
Zn ²⁺	3.17 10 ⁻⁴	3.1	---	---

6. DISCUSIÓN



Las infecciones fúngicas son una importante causa de enfermedad y muerte en todo el mundo representando un desafío sanitario emergente, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Particularmente las producidas por algunas especies del género *Fusarium* han aumentado significativamente en los últimos años especialmente en pacientes con neoplasias hematológicas (Enoch *et al.*, 2017). Recientemente esta situación ha empeorado debido a la emergencia de resistencias frente a los antifúngicos debido a su mal uso en clínica. Ello ha forzado a los hongos a evolucionar frente a esta presión selectiva lo que ha conducido necesariamente a la búsqueda de factores de virulencia involucrados en dichas infecciones y por consiguiente de nuevas dianas terapéuticas.

Por otro lado, muchas de las especies incluidas en el género *Fusarium* incluyen un gran número de especies fitopatógenas, causantes de marchitez vascular o productoras de toxinas letales; como por ejemplo *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* o *F. solani*, entre otras (Moss *et al.*, 1984).

En los procesos infecciosos y especialmente en la lucha entre el hongo y el huésped los metales juegan un papel fundamental en la que este último crea un ambiente enriquecido en metales para dificultar el crecimiento microbiano y su virulencia (Hood *et al.*, 2012) además de dificultar la absorción de metales por parte de los microorganismos (Weinberg, 1975). Por consiguiente, los hongos han desarrollado sistemas reguladores de absorción y desintoxicación para metales esenciales como el hierro, zinc, cobre, níquel o manganeso. En este sentido y para intentar contribuir a la elucidación de los procesos involucrados en la absorción y desintoxicación de metales pesados en los hongos, en la presente tesis doctoral nos hemos propuesto caracterizar la metalotioneína Mt1, FOXG_02862, presente en el genoma de *F. oxysporum* y una de sus exportadoras de Cu, una ATPasa CrpF, FOXG_03265.

6.1. El genoma de *F. oxysporum* codifica una única hipotética metalotioneína

El análisis *in silico* en la base de datos del genoma de *F. oxysporum* ha permitido la identificación de un único gen codificante de una metalotioneína (*mt1*) con un 68,8 % de identidad con una “copper resistance protein” (NCU05512) de *N. crassa*. La presencia de secuencias consenso relacionadas con la respuesta a metales en la región promotora del gen *mt1* demostró su participación en la respuesta a los metales y al estrés oxidativo. Estas secuencias, conocidas como elementos de respuesta,

también fueron identificadas en la región promotora de los genes que codifican para MTs en el hongo *Suillus luteus* (Nguyen *et al.*, 2017). Las más conocidas son: elementos de respuesta al estrés (STRE), elementos de respuesta antioxidante (ARE), elementos de respuesta a metales (MRE) y elementos sensibles al Cu (CuSE), entre otros. Además, la secuencia aminoacídica de Mt1 contiene múltiples residuos de cisteínas organizados en los motivos C-C o C-X-C, que por otra parte están muy conservados en las MTs fúngicas (Capdevila *et al.*, 2011).

Mt1 de *F. oxysporum* destaca por no presentar la típica secuencia corta de aminoácidos asociada a MTs, que oscila de 24 a 85 aminoácidos, sino que se compone de 111 aminoácidos. Sin embargo, secuencias largas de MTs ya habían sido reportadas en otros organismos tales como *C. neoformans* (Ding *et al.*, 2013), *Trichomonas vaginalis* (Capdevila *et al.*, 2011), *Tremella mesenterica* (Iturbe-Espinoza *et al.*, 2016) o *Tetrahymena thermophila* (Espart *et al.*, 2015). La mayor longitud de estas MTs podría deberse a una duplicación génica que generaría proteínas quiméricas con una organización de cisteínas en grupos repetidos, correspondiendo cada uno de ellos a una MT ancestral más pequeña (Capdevila *et al.*, 2011; Ziller *et al.*, 2018).

Con la secuencia de *mt1* (FOXG_02862) de *F. oxysporum* realizamos un BLASTp e hicimos un análisis filogenético con las secuencias proteínicas obtenidas. El árbol resultante evidenció una amplia distribución de Mt1 entre las diferentes especies fúngicas incluyendo otros fitopatógenos y patógenos oportunistas humanos, mostrando, sin embargo, una alta divergencia entre ellas en su secuencia aminoacídica. La distribución de las MTs ha resultado ser muy heterogénea dentro del árbol que engloba a todos los seres vivos. En el caso del clado *Fungi* la subdivisión *Ascomycota* presenta 6 familias diferentes de MTs (Ziller *et al.*, 2018), mientras que las MTs presentes en los basidiomicetos no se incluyen en ninguna de las familias conocidas. La distribución filogenética de las MTs está sesgada a favor de los organismos eucariotas pluricelulares, no observándose, sin embargo, en todos los filos diversidad en la secuencia de dichas proteínas. Todo ello hace pensar en un posible origen polifilético de las MTs, como resultado de posibles múltiples eventos de evolución convergente. Es probable también que nuevas secuencias de MTs estén aún por descubrir (Capdevila *et al.*, 2011; Ziller *et al.*, 2018).

La diversidad funcional de las MTs permite explicar también la diversidad en sus secuencias (Blindauer *et al.*, 2010). Se ha perdido ya la clásica percepción de que las MTs podían ser consideradas como simples "esponjas que unían metales" y se ha

llegado a la conclusión de que se trata de una familia proteica con un rol esencial en el tráfico y en la homeostasis de iones metálicos esenciales (Blindauer *et al.*, 2010).

6.2. Inducción de *mt1* por metales o estrés oxidativo

El análisis transcripcional de *mt1* de *F. oxysporum* reveló una clara inducción por zinc la cual se corresponde con nuestros resultados preliminares de ESI-MS (espectrometría de masas con ionización por electrospray) y de ICP-AES (espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado por inducción) en los cuales se observó una supuesta predilección de Mt1 por dicho metal. Esta Mt1 podría ser una tioneína de unión al Zn a diferencia de las dos MTs largas de *C. neoformans* CnMT1 y CnMT2 las cuales se consideran genuinas tioneínas de Cu (Palacios *et al.*, 2014). En un estudio realizado en 2015 por Espart y col. en el protozoo *Tetrahymena thermophila* se identificaron cinco MTs, tres de ellas tioneínas de Cadmio y dos de Cu (Espart *et al.*, 2015). Para establecer las preferencias metálicas de una MT determinada es necesario interrelacionar los resultados obtenidos al:

- Expresar el gen que codifique para la supuesta MT bajo inducción de metales pesados
- Analizar la filogenia de dicha MT
- Sintetizar *in vitro* el complejo recombinante MT unido a metales pesados

El hecho de haber identificado una única hipotética MT en el genoma de *F. oxysporum* no excluye el hecho de que puedan existir otras MTs en dicho genoma con afinidades por otros metales como el Cu o el Cd y que no se puedan deducir por ortología con otras descritas ya que podrían pertenecer a una familia desconocida de MTs.

La evaluación del crecimiento de la cepa silvestre, del mutante $\Delta mt1$ y de la cepa complementada $\Delta mt1^c$ en presencia de metales pesados nos ha permitido asociar la falta del gen *mt1* con una menor tolerancia a estos iones tóxicos. Sin embargo considerando el conjunto de resultados de expresión génica, de ESI-MS, de ICP-AES y tolerancia a metales cabe decir que la sensibilidad que presentó dicho mutante frente a compuestos que contenían Zn no fue tan drástica como se esperaba. Aún así en nuestro estudio concluimos que $\Delta mt1$ mostró una reducción en la tolerancia a Cd, Cu y Zn. Nuestros resultados demuestran que existe una participación de *mt1* en la tolerancia a los metales, aunque otros mecanismos podrían estar también involucrados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en otros hongos, la carencia de *mt1* en *F. oxysporum* se esperaría que activará la transcripción de *crpF* y *aceA* en condiciones de estrés por metales tóxicos, ya que ambos están involucrados en la homeostasis de metales. Este es el caso de *S. cerevisiae* en el que el factor de transcripción Ace1p activa la expresión de los genes que codifican para las metalotioneínas CUP1 y CRS5 (Culotta *et al.*, 1994; Ecker *et al.*, 1986; Thiele, 1988). La ausencia *mt1* en *F. oxysporum* no parece alterar los niveles transcripcionales de *aceA* por lo que otros sistemas de regulación deben de estar actuando.

Otro dato relevante sobre las MTs es su función como antioxidantes frente a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno ya que se ha demostrado que eliminan radicales libres *in vitro* gracias a sus grupos cisteinil tiolato (Sato *et al.*, 1993). La presencia de la secuencia consenso ARE (elemento de respuesta antioxidante) en la región promotora de *mt1* es un indicador de una respuesta transcripcional de dicho gen frente a moléculas que inducen estrés oxidativo. Cabe destacar que *gapdh* y *prx* aumentan su expresión en presencia de Zn en la cepa silvestre, ya que se ha demostrado que el estrés celular lleva al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de otros antioxidantes como el Zn (Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013). Sin embargo el análisis de la expresión génica de ambos genes demostró que solo el exceso de Zn parece desencadenar estrés oxidativo debido a la falta de *mt1*. Dados los resultados creemos que sería adecuado analizar la expresión de *gapdh* y *prx* en presencia del inductor de estrés oxidativo H₂O₂ y asimismo analizar otros genes relacionados con estrés oxidativo (Baig *et al.*, 2019).

6.3. *mt1* en virulencia

La delección de *mt1* no afectó a la supervivencia ni a la virulencia de *F. oxysporum* tanto en un modelo de infección sistémica murino como en otro infeccioso de la planta del tomate. Este hecho no es de extrañar ya que se han reportado tanto metalotioneínas que contribuyen a la virulencia (Ding *et al.*, 2013; Tucker *et al.*, 2004) como otras que no (Wiemann *et al.*, 2017). Durante la infección tiene lugar una interacción en la que el hongo trata de disminuir o eliminar los metales tóxicos del ambiente que le rodea generados por los macrófagos del huésped. La detoxificación de metales es por lo tanto la principal acción virulenta de los hongos en las infecciones fúngicas que tienen lugar en mamíferos. Parece ser que en este proceso de detoxificación no participan las MTs en *F. oxysporum* en un modelo de infección murino sistémico, o si lo hacen sería en coordinación con una maquinaria molecular aun no descrita.

Los estudios de infección de macrófagos murinos con las diferentes cepas fúngicas revelaron menor capacidad de supervivencia de los conidios de $\Delta mt1$ y recuperados de los fagolisosomas de los macrófagos en comparación con el wt ($p = 0,003$). Este resultado es coherente con el hecho de que la ausencia de *mt1* esté haciendo más vulnerable al hongo frente a iones metálicos tóxicos y a especies reactivas de oxígeno, los cuales son movilizados dentro del fagolisosoma de los macrófagos del huésped como estrategia de ataque (Wiemann *et al.*, 2017). En particular, la acumulación de Cu y Zn parece ser un componente crítico en el espectro antimicrobiano de los macrófagos y, por lo tanto, proteínas involucradas en la homeostasis de los metales como las MT podrían participar en la defensa fúngica (Stafford *et al.*, 2013).

En nuestro ensayo de muerte de macrófagos murinos concluimos que la capacidad disminuida de $\Delta mt1$ de producir una infección activa dependió en gran parte de su habilidad para germinar antes de la activación de los macrófagos matando a dichas esporas. Los macrófagos alveolares bronquiales son células fagocíticas que representan la primera línea de defensa contra una infección por *C. neoformans* en el pulmón en mamíferos (Brummer, 1998; Kronstad *et al.*, 2011) y se ha demostrado que las esporas de dicho hongo son inmediatamente fagocitadas por los macrófagos, dentro de los cuales pueden germinar y replicarse (Esher *et al.*, 2018). Sin embargo, los macrófagos activos pueden matar rápidamente a las esporas que no han logrado germinar las cuales son altamente susceptibles a las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Giles *et al.*, 2009).

6.4. MT1 se localiza principalmente en fracciones enriquecidas en retículo endoplásmico (RE) y membrana plasmática

La localización subcelular de Mt1 en fracciones citosólicas enriquecidas en RE y en la membrana plasmática concuerda con estudios anteriores en otros hongos. Concretamente la metalotioneína Mmt1 de *M. grisea* ha sido localizada mediante microscopia electrónica en la periferia celular, y además de forma más abundante en la pared celular (Tucker *et al.*, 2004). Esta localización fuera de la célula sorprende puesto que Mmt1 no presenta péptido señal característico de las proteínas del sistema de secreción. Igualmente., en *C. neoformans* la distribución subcelular de las dos isoformas de metalotioneínas que presenta, Cmt1 y Cmt2 también resultó ser en la periferia celular (Ding *et al.*, 2013). En el caso de Mt1, se determinó también su presencia en fracciones enriquecidas en Aparato de Golgi y en otras fracciones citosólicas, lo cual también se observó en la localización de Mmt1 de *M. grisea* (Tucker *et al.*, 2004).

De acuerdo con estos hallazgos podemos afirmar que Mt1 es una proteína citosólica con mayor localización en la parte próxima a la membrana plasmática. Sin embargo, aún son necesarios nuevos estudios para determinar cambios en su localización subcelular en respuesta a condiciones de toxicidad por metales o su posible translocación a la pared fúngica.

6.5. Transportadores de cobre (Cu) en *F. oxysporum*

El análisis *in silico* de transportadores de Cu en el genoma de *F. oxysporum* reveló la presencia de seis transportadores de Cu ortólogos de *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans* y *C. albicans*. Previamente, Wiemann *et al.* en 2017 habían elaborado una lista con las proteínas de unión a cobre más relevantes en todos los hongos anteriormente mencionados (Wiemann *et al.*, 2017). En esta búsqueda *in silico* nosotros también incluimos los ortólogos en *Neurospora crassa* dado que es un importante organismo modelo en la investigación genética, celular y bioquímica (Davis *et al.*, 2002; Seiler *et al.*, 2003) además de estar muy relacionado filogenéticamente con *F. oxysporum*. La búsqueda de estos genes que codifican para diferentes transportadores de Cu en *F. oxysporum* reveló que el grado de identidad con sus ortólogos en *A. fumigatus* oscila de 42,3 % a 47,3 %. Entre los seis transportadores de Cu encontrados nos centramos en el estudio de la proteína ortóloga en *F. oxysporum* CrpF (FOXG_03265), una ATPasa exportadora de Cu CrpA relacionada con virulencia en *A. fumigatus* (Wiemann *et al.*, 2017) y en *A. flavus* (Yang *et al.*, 2018).

CrpF estaría dentro de la familia proteica ATPasas tipo P las cuales son bombas iónicas que usan la energía almacenada en el ATP para transportar iones a través de las membranas celulares en contra de un gradiente de concentración (Kuhlbrandt, 2004). Y dentro de las ATPasas tipo P, CrpF pertenecería a las tipo IB cuyos sustratos son los metales de transición iónicos “blandos”, como el Cu^+ , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} o Pb^{2+} . Estas proteínas ATPasas de Cu tipo P_{1B} presentan unos dominios característicos los cuales también hemos identificado en CrpF que son:

- Dominios hélices transmembrana, uno de los cuales, el TMH₆ contiene el dominio de translocación del Cu, CPC (Cys-Pro-Cys) (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2017; Cater *et al.*, 2007). Estos 8 dominios transmembrana han sido reportados en ATPasas de Cu en humanos, levaduras, bacterias o arqueas (Barry *et al.*, 2010; Mandal *et al.*, 2002; Migocka, 2015; Rosenzweig *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2016; Solioz *et al.*, 1995).
- Dominios de unión a metales (MBD) conformados por las secuencias específicas de unión a Cu localizadas en la región NH₂-terminal que contienen

las secuencias consenso CxxC. Otros dominios asociados a metales pesados (HMA) que contienen la secuencia consenso GMxCxxC. El análisis de secuencia de CrpF reveló que presentaba 3 MBD ("metal binding domain") y un único HMA ("heavy metal associate domain") a diferencia de los ortólogos CrpA en *A. nidulans* y CaCrp1p en *C. albicans* que presentan ambos 2 MBD y 3 HMA (Antsotegi-Uskola *et al.*, 2017).

- Dominios fosfatasa, aspartil quinasa y de unión a ATP característicos de las ATPasas tipo P_{1B} exportadoras de Cu.

A diferencia de *A. flavus* que contiene en su genoma dos parálogos de *crp*, *crpA* y *crpB*, *F. oxysporum* y *A. fumigatus* solo poseen una copia de este gen. Esta duplicación génica ha sido identificada en otros transportadores de metales en metazoos (Logeman *et al.*, 2017) o en la levadura *Hortaea werneckii* (Lenassi *et al.*, 2013). Las duplicaciones génicas en transportadores de metales en levaduras pueden deberse a procesos de neofuncionalidad (Logeman *et al.*, 2017) o a una mejora adaptativa en la eficiencia del transportador metálico (Yang *et al.*, 2018). Creemos que la falta de esta duplicación génica en CrpF de *F. oxysporum* podría deberse a que se trata de un organismo más sofisticado evolutivamente que los metazoos o las levaduras, y que por lo tanto, presenta una maquinaria génica y proteica para regular sus procesos celulares que ha tendido a la simplificación como mecanismo evolutivo de ahorro.

De los ortólogos de CrpF identificados en otros hongos el 39 % son hongos parásitos, 30 % son fitopatógenos, 48 % son patógenos oportunistas humanos y 48 % son patógenos de artrópodos. Por lo que concluimos que este transportador de Cu está conservado entre hongos potencialmente patógenos y de relevancia económica en cuanto a infección de cultivos y clínica.

La selección de CrpF como objeto de estudio se debió a la importancia en virulencia de su ortólogo CrpA en *A. fumigatus*, sin embargo, dentro de las ATPasas tipo P_{1B} la divergencia de proteínas es alta. Curiosamente respecto a la diversidad de las ATPasas tipo P_{1B}, las proteínas humanas ATP7A o ATP7B que dan lugar al síndrome de Menkes o de Wilson respectivamente son más similares a sus homólogos bacterianos que a sus homólogos fúngicos (Askwith *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2014). Las diferencias principales son que estas Cu-ATPasas fúngicas presentan uno o varios motivos CxxC que no están presentes en las humanas o bacterianas.

Resulta importante señalar que la proteína CrpF en la que hemos basado nuestro estudio formaría parte del sistema de defensa fúngico en un escenario de infección y las ATPasas ATP7A y ATP7B en humanos y sus ortólogas en mamíferos formarían

parte del sistema de defensa del huésped frente a los microorganismos. Durante los procesos infecciosos los macrófagos del huésped de mamíferos acumulan Cu en el fagosoma y la expresión de la ATP7A disminuye, evitando la salida del metal para intoxicar al microorganismo con Cu.

6.6. Inducción de *crpF* por metales o estrés oxidativo

El análisis transcripcional demostró una clara y significativa inducción de *crpF* en presencia de Cu ($p = 0.0015$) en el wt, algo que no ocurre en presencia de Cd o Zn. Este resultado, junto con la extrema sensibilidad del mutante $\Delta crpF$ frente a concentraciones bajas de CuSO_4 (0,4 mM) demuestran el rol de esta proteína en la homeostasis del Cu. Nuestros resultados de expresión génica y tolerancia a metales coinciden con los ya reportados en la proteína ortóloga en *A. fumigatus*, CrpA (Wiemann *et al.*, 2017).

La regulación de *crpA* por parte del factor de transcripción AceA sensible al Cu en *A. fumigatus* es uno de los mecanismos de defensa contra los macrófagos del huésped en procesos infecciosos (Wiemann *et al.*, 2017). Sin embargo, al contrario de lo esperado la expresión de *aceA* disminuyó en presencia de Cu en el mutante $\Delta crpF$, aunque no de forma significativa.

El análisis de la expresión génica de *gapdh* y *prx* demostró que el exceso de Zn o Cu desencadenó mayor estrés oxidativo debido a la falta de *crpF* en *F. oxysporum*. Este resultado coincide con la estrategia de defensa de *A. fumigatus* que tiene lugar durante los procesos infecciosos que consiste en sobreexpresar *crpA* que es activada por AceA. La expresión constitutiva de *crpF* a su vez regula la defensa fúngica contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) liberadas por el huésped para matar a los conidios de *A. fumigatus* (Wiemann *et al.*, 2017).

6.7. *crpF* en virulencia

La falta de *crpF* alteró la capacidad patogénica de *F. oxysporum* en plantas de tomate ya que cuando las raíces de tomate fueron inoculadas con las suspensiones de conidios del $\Delta crpF$ mostraron una mortalidad significativamente menor que las infectadas con el wt o con el $\Delta crpF^c$ ($p < 0.0001$ and $p = 0.0020$, respectivamente).

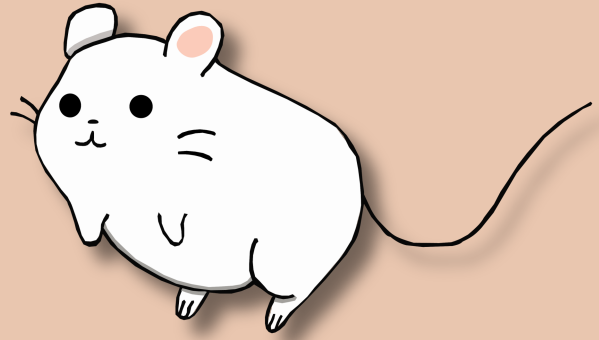
Solo existe otro estudio que haya demostrado el papel fitopatogénico de CrpF. Yang y col. demostraron que los dos homólogos de CrpF en *A. flavus*, CrpA y CrpB, no mostraron virulencia en semillas de maíz tratadas con Cu. Además, los dobles

mutantes $\Delta crpA\Delta crpB$ presentaron reducción de la virulencia en un modelo murino de aspergillosis invasiva (Yang *et al.*, 2018).

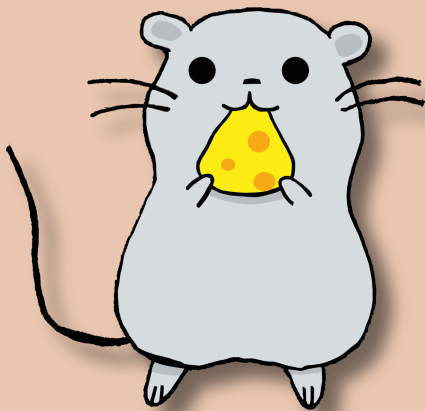
Nuestro resultado es acorde con un estudio previo en el fitopatógeno filamentoso *Botrytis cinerea* en el que la ausencia de la ATPasa transportadora de Cu del Aparato de Golgi (BcCCC2), la cual presenta un 43,5 % de identidad con CrpF, causa la reducción de virulencia en infecciones de hojas de planta de tomate (Saitoh *et al.*, 2010).

Por otro lado, CrpF no participa en la resistencia a los macrófagos murinos en *F. oxysporum*; ni existieron diferencias significativas entre la cepa $\Delta crpF$ y la wt en la infección de ratones. Aun así, cabe destacar que las tasas de mortalidad de los ratones inmunosuprimidos infectados con el wt y con el mutante $\Delta crpF$ fueron 37,5 % y 75 %, respectivamente; por lo que el mutante resultó más virulento que el wt pero sin ser una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.054$). Sin embargo, la proteína ortóloga en *A. fumigatus* CrpA resultó esencial para la virulencia en infecciones fúngicas de ratones y se observó una disminución en la supervivencia de las esporas de *A. fumigatus* fagocitadas en macrófagos murinos (Wiemann *et al.*, 2017).

Dados estos resultados, creemos que tanto CrpF como Mt1 podrían estar involucradas en el proceso infeccioso pulmonar pero no sistémico en mamíferos y que por lo tanto sería interesante una línea de investigación trazada hacia esta dirección. La base de esta hipótesis es que en las infecciones oportunistas en humanos diferentes especies de *Fusarium* generalmente entran por las vías respiratorias vía inhalación de los conidios presentes en el aire; además los pulmones están involucrados en el 31 % al 41 % de todos los casos de fusariosis (Guarro *et al.*, 1995; Merz *et al.*, 1988; Wheeler *et al.*, 1981).



7. CONCLUSIONES



1. El genoma de *Fusarium oxysporum* contiene una única metalotioneína (Mt1, FOXG_02862) cuya secuencia promotora presenta elementos reguladores de metales (metal regulatory elements, MRE), y la secuencia proteica deducida contiene dominios ricos en cisteínas, todos ellos característicos de este tipo de metaloproteína.

2. La ausencia de *mt1* afecta a la capacidad de crecimiento del hongo en presencia de metales pesados, causando reducción de la tolerancia a Cd, Cu y Zn.

3. La respuesta transcripcional del wt en presencia de metales pesados conduce a la sobreexpresión de *mt1* solo en presencia de Zn. Por lo tanto, Mt1 participa en la homeostasis del Zn de forma activa (Maret, 2017).

4. Mt1 tiene preferencia para enlazar Zn^{2+} , comportándose así como una Zn-tioneína, según los resultados obtenidos por ESI-MS e ICP-AES.

5. Mt1 no es esencial en la patogénesis fúngica en los sistemas modelo estudiados, vegetal en la plata de tomate y animal en modelo murino, resultando el mutante defectivo igualmente virulento. Sin embargo, Mt1 contribuye a la resistencia a macrófagos, ya que su carencia reduce la supervivencia fúngica dentro del fagosoma.

6. El genoma de *F. oxysporum* contiene 6 genes que codifican para hipotéticos transportadores de Cu ortólogos a *S. cerevisiae* y *A. fumigatus*, de los cuales *crpF* (FOXG_03265) se ha identificado como una ATPasa exportadora de Cu ortóloga a *A. fumigatus*.

7. La proteína deducida CrpF presenta dominios característicos de transportadores de metales: ocho hélices transmembrana que contienen el motivo CPC, dominios de unión a metales CxxC y dominios asociados a metales pesados GMxCxxC.

8. La ausencia de *crpF* afecta a la capacidad de crecimiento del hongo en presencia de metales pesados, causando una drástica reducción de la tolerancia a Cu, y en menor medida a Cd y Zn.

9. La respuesta transcripcional del wt en presencia de metales pesados conduce a la sobreexpresión de *crpF* solo en presencia de Cu. Por lo tanto, CrpF es un transportador de Cu de forma específica.

10. La respuesta transcripcional del mutante $\Delta crpF$ frente a metales pesados conduce a la activación de la metalotioneína *mt1*, del factor de transcripción *aceA* y de la peroxiredoxina *prx* solo en presencia de Zn, lo que indica que la ausencia de *crpF* activa la maquinaria de regulación de homeostasis y detoxificación.

11. El contenido de Cu intracelular del mutante $\Delta crpF$ es aproximadamente un 31 % superior al presentado por la estirpe silvestre en condiciones de exceso de Cu, lo que indica que la ausencia del gen conduce a una mayor acumulación de Cu y a una menor capacidad de detoxificación de este ion metálico.

12. CrpF es esencial en el desarrollo de infección fúngica en plantas de tomate, sin embargo, la carencia del gen no afecta a la virulencia del hongo en ambos modelos de infección animal, el murino y la línea celular de macrófagos murinos.

13. La proteína Mt1 se ha detectado como proteína dimérica de ~27 kDa en fracciones subcelulares enriquecidas en retículo endoplasmático, membranas y fracciones citosólicas.

7.1. Conclusions

1. The *Fusarium oxysporum* genome contains a unique metallothionein (Mt1, FOXG_02862). The promoter sequence of this metallothionein presents metal regulatory elements (MRE), and its deduced protein sequence contains cysteine-rich domains, all of them characteristic of this type of metalloprotein.

2. A lack of *mt1* affects fungal growth capacity in the presence of heavy metals, reducing tolerance to Cd, Cu and Zn.

3. wt transcriptional response in the presence of heavy metals leads to *mt1* overexpression only in the presence of Zn. Therefore, Mt1 actively participates in Zn homeostasis (Maret, 2017).

4. Mt1 has a preference to bind Zn^{2+} , thus acting as a Zn-thionein, based on the ESI-MS and ICP-AES results.

5. Mt1 is not essential to fungal pathogenesis in the models studied (vegetable in tomato plants and animal in a murine model), with the defective mutant exhibiting similar virulence. However, Mt1 contributes to macrophage resistance, as its absence reduces fungal survival inside phagosomes.

6. *F. oxysporum* genome contains 6 genes encoding hypothetical Cu transporters orthologous to *S. cerevisiae* and *A. fumigatus*. Among them *crpF* (FOXG_03265) has been identified as an ATPase copper exporter orthologous to *A. fumigatus*.

7. The hypothetical protein CrpF presents characteristic domains of metal transporters: 8 transmembrane helices which contain the CPC motif, metal-binding CxxC and heavy-metal-associated domains GMxCxxC.

8. A lack of *crpF* affects fungal growth capacity in the presence of heavy metals, leading to a drastically reduced tolerance to Cu, and to a lesser extent, to Cd and Zn.

9. The wt transcriptional response in the presence of heavy metals leads to *crpF* overexpression only in the presence of Cu. Therefore, CrpF is specifically a Cu transporter.

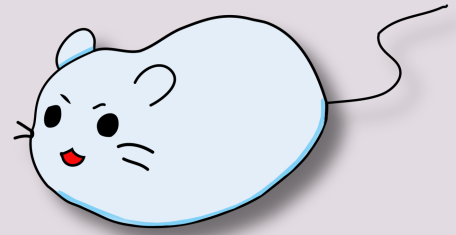
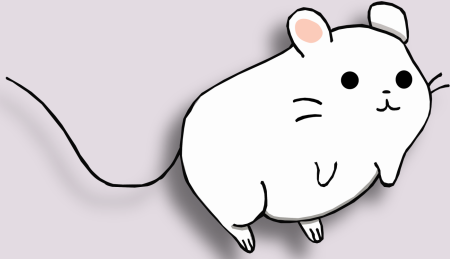
10. The $\Delta crpF$ mutant transcriptional response to heavy metals leads to activation of the metallothionein *mt1*, the transcription factor *aceA* and the peroxiredoxin *prx* only in the presence of Zn, indicating that the absence of *crpF* activates the regulation machinery of homeostasis and detoxification.

11. The intracellular Cu content of the $\Delta crpF$ mutant is approximately 31% higher than that presented by the wt under conditions of excess Cu, indicating that the

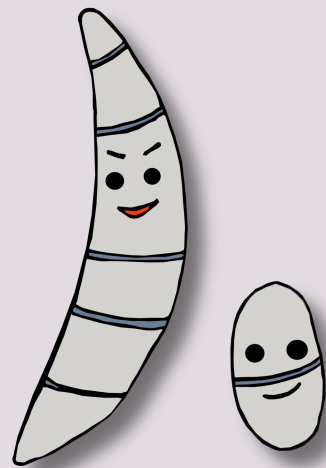
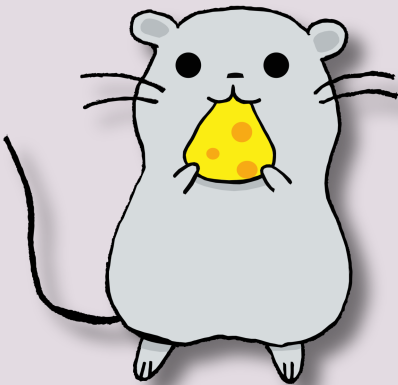
absence of the gene leads to greater accumulation of Cu and lower detoxification capacity of this metal ion.

12. CrpF is essential for the development of fungal infection in tomato plants; however, the lack of the gene does not affect the virulence of the fungus in either animal infection model (murine or murine macrophage cell line).

13. Mt1 protein has been detected as a ~27 kDa dimeric protein in subcellular fractions enriched in endoplasmic reticulum, membranes and cytosolic fractions.



8. REFERENCIAS



Adamo GM, Brocca S, Passolunghi S, Salvato B and Lotti M. (2012). Laboratory evolution of copper tolerant yeast strains. *Microb Cell Fact*, 11, 1.

Agrios G. (1988). *Plant Pathology* (3rd Edition ed.). New York: Academic Press.

Agrios G. (1997). Chapter 9: Control of Plant Diseases. In *Plant Pathology*. (4th Edition ed., pp. 200-216). San Diego: Academic Press.

Al-Hatmi AM, Bonifaz A, Calderon L, Curfs-Breuker I, Meis JF, van Diepeningen AD and de Hoog GS. (2015). Proximal subungual onychomycosis caused by *Fusarium falciforme* successfully cured with posaconazole. *Br J Dermatol*, 173(1), 253-255.

Al-Hatmi AM, Bonifaz A, de Hoog GS, Vazquez-Maya L, Garcia-Carmona K, Meis JF and van Diepeningen AD. (2014). Keratitis by *Fusarium temperatum*, a novel opportunist. *BMC Infect Dis*, 14, 588.

Al-Hatmi AM, Meis JF and de Hoog GS. (2016). *Fusarium*: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. *PLoS Pathog*, 12(4), e1005464.

Al-Rezqi A, Hawkes M, Doyle J, Richardson SE and Allen U. (2009). Invasive mold infections in iatrogenically immunocompromised children: an eight-yr review. *Pediatr Transplant*, 13(5), 545-552.

Aljanabi SM and Martinez I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. In *Nucleic Acids Res* (Vol. 25, pp. 4692-4693).

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-3402.

Amich J, Vicentefranqueira R, Leal F and Calera JA. (2010). *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfC* and *aspf2* genes. *Eukaryot Cell*, 9(3), 424-437.

Andrews GK. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol*, 59(1), 95-104.

Antebi A and Fink GR. (1992). The yeast $\text{Ca}^{(2+)}$ -ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell*, 3(6), 633-654.

Antsotegi-Uskola M, Markina-Inarrairaegui A and Ugalde U. (2017). Copper Resistance in *Aspergillus nidulans* Relies on the P_I-Type ATPase CrpA, Regulated by the Transcription Factor AceA. *Front Microbiol*, 8, 912.

Antsotegi-Uskola M, Markina-Inarrairaegui A and Ugalde U. (2019). New insights into copper homeostasis in filamentous fungi. *Int Microbiol*.

Artells E, Palacios O, Capdevila M and Atrian S. (2013). Mammalian MT1 and MT2 metallothioneins differ in their metal binding abilities. *Metallomics*, 5(10), 1397-1410.

Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM *et al.* (1994). The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*, 76(2), 403-410.

Askwith C and Kaplan J. (1998). Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem Sci*, 23(4), 135-138.

Askwith CC, de Silva D and Kaplan J. (1996). Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 20(1), 27-34.

Azor M, Cano J, Gene J and Guarro J. (2009). High genetic diversity and poor in vitro response to antifungals of clinical strains of *Fusarium oxysporum*. *J Antimicrob Chemother*, 63(6), 1152-1155.

Babich H and Stotzky G. (1977). Sensitivity of Various Bacteria, Including Actinomycetes, and Fungi to Cadmium and the Influence of pH on Sensitivity. *Appl Environ Microbiol*, 33(3), 681-695.

Baig S, Parvaresh Rizi E, Chia C, Shabeer M, Aung N, Loh TP, Magkos F *et al.* (2019). Genes Involved in Oxidative Stress Pathways Are Differentially Expressed in Circulating Mononuclear Cells Derived From Obese Insulin-Resistant and Lean Insulin-Sensitive Individuals Following a Single Mixed-Meal Challenge. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 256.

Balamurugan K and Schaffner W. (2006). Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), 737-746.

Ballestin R, Molowny A, Marin MP, Esteban-Pretel G, Romero AM, Lopez-Garcia C, Renau-Piqueras J *et al.* (2010). Ethanol reduces zincosome formation in cultured astrocytes. *Alcohol Alcohol*, 46(1), 17-25.

Ballou ER and Wilson D. (2016). The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 32, 128-134.

Banerjee D, Onosaka S and Cherian MG. (1982). Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology*, 24(2), 95-105.

Barry AN, Shinde U and Lutsenko S. (2010). Structural organization of human Cu-transporting ATPases: learning from building blocks. *J Biol Inorg Chem*, 15(1), 47-59.

Basenko EY, Pulman JA, Shanmugasundram A, Harb OS, Crouch K, Starns D, Warrenfeltz S *et al.* (2018). FungiDB: An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. *J Fungi (Basel)*, 4(1).

Beattie JH, Wood AM, Newman AM, Bremner I, Choo KH, Michalska AE, Duncan JS *et al.* (1998). Obesity and hyperleptinemia in metallothionein (-I and -II) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1), 358-363.

Beckman CH. (1987). *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. St. Paul, Minnesota: APS Press.

Beltramini M and Lerch K. (1982). Copper transfer between *Neurospora* copper metallothionein and type 3 copper apoproteins. *FEBS Lett*, 142(2), 219-222.

Berg JM, Tymoczko JL and Stryer L. (2002). *Biochemistry* (5th edition ed.). New York.

Bertin G and Averbeck D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11), 1549-1559.

Bhatt VR, Viola GM and Ferrajoli A. (2011). Invasive fungal infections in acute leukemia. *Ther Adv Hematol*, 2(4), 231-247.

Binz PA and Kägi JHR. (1999). Metallothionein: molecular evolution and classification. In K C. (Ed.), *Metallothionein IV*. Basel: Birkhauser Verlag

Bird AJ, Zhao H, Luo H, Jensen LT, Srinivasan C, Evans-Galea M, Winge DR *et al.* (2000). A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator. *Embo J*, 19(14), 3704-3713.

Blatzer M and Latge JP. (2017). Metal-homeostasis in the pathobiology of the opportunistic human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Opin Microbiol*, 40, 152-159.

Bleackley MR and Macgillivray RT. (2011). Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biomaterials*, 24(5), 785-809.

Blindauer CA. (2014). *Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells. Chapter 21: Metallothioneins*. . London: Royal Society of Chemistry.

Blindauer CA and Leszczyszyn OI. (2010). Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. *Nat Prod Rep*, 27(5), 720-741.

Bofill R, Capdevila M and Atrian S. (2009). Independent metal-binding features of recombinant metallothioneins convergently draw a step gradation between Zn- and Cu-thioneins. *Metallomics*, 1(3), 229-234.

Bonaventura P, Benedetti G, Albareda F and Miossec P. (2015). Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev*, 14(4), 277-285.

Bonifaz A, Cruz-Aguilar P and Ponce RM. (2007). Onychomycosis by molds. Report of 78 cases. *Eur J Dermatol*, 17(1), 70-72.

Booth C. (1971). *The genus Fusarium*: C.A.B.

Borrelly GP, Harrison MD, Robinson AK, Cox SG, Robinson NJ and Whitehall SK. (2002). Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, 277(33), 30394-30400.

Bourdineaud JP, Baudrimont M, Gonzalez P and Moreau JL. (2006). Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie*, 88(11), 1787-1792.

Boutati EI and Anaissie EJ. (1997). *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood*, 90(3), 999-1008.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD and Papayannopoulos V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*, 15(11), 1017-1025.

Brenner AJ and Harris ED. (1995). A quantitative test for copper using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 226(1), 80-84.

Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I and Lux A. (2007). Zinc in plants. *New Phytol*, 173(4), 677-702.

Brummer E. (1998). Human defenses against *Cryptococcus neoformans*: an update. *Mycopathologia*, 143(3), 121-125.

Burnett J. (1984). Aspects of *Fusarium* genetics. In *The Applied Mycology of Fusarium. Symposium of the British Mycological Society* (Vol. 7, pp. 39-69). New York: Cambridge University Press.

Butt TR, Sternberg EJ, Gorman JA, Clark P, Hamer D, Rosenberg M and Crooke ST. (1984). Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(11), 3332-3336.

Cai Z, Du W, Zeng Q, Long N, Dai C and Lu L. (2017). Cu-sensing transcription factor Mac1 coordinates with the Ctr transporter family to regulate Cu acquisition and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*, 107, 31-43.

Cai Z, Du W, Zhang Z, Guan L, Zeng Q, Chai Y, Dai C *et al.* (2018). The *Aspergillus fumigatus* transcription factor AceA is involved not only in Cu but also in Zn detoxification through regulating transporters CrpA and ZrcA. *Cell Microbiol*, 20(10), e12864.

Capdevila M and Atrian S. (2011). Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem*, 16(7), 977-989.

Capdevila M, Bofilla R, Palacios O and Atrian S. (2012). State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coord. Chem. Rev.*, 256(1-2), 46– 62.

Carbone I and Kohn LM. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.

Carroll AM, Sweigard JA and Valent B. (1994). Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genet. Newsl*, 41.

Castro Lopez N, Casas C, Sopo L, Rojas A, Del Portillo P, Cepero de Garcia MC and Restrepo S. (2009). *Fusarium* species detected in onychomycosis in Colombia. *Mycoses*, 52(4), 350-356.

Cater MA, La Fontaine S and Mercer JF. (2007). Copper binding to the N-terminal metal-binding sites or the CPC motif is not essential for copper-induced trafficking of the human Wilson protein (ATP7B). *Biochem J*, 401(1), 143-153.

Catlett NL, Lee BN, Yoder OC and Turgeon BG. (2003). Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Newsletter*., 50, 9-11.

Citiulo F, Jacobsen ID, Miramon P, Schild L, Brunke S, Zipfel P, Brock M *et al.* (2012). *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathog*, 8(6), e1002777.

Clemens S, Naumann B and Hippler M. (2009). Proteomics of metal mediated protein dynamics in plants - iron and cadmium in the focus. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 1955-1969.

Clemons KV, Espiritu M, Parmar R and Stevens DA. (2005). Comparative efficacies of conventional amphotericin b, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(12), 4867-4875.

Coleman JE. (1998). Zinc enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2(2), 222-234.

Collingwood TN, Urnov FD and Wolffe AP. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol*, 23(3), 255-275.

Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL *et al.* (2008). Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*, 319(5865), 962-965.

Cousins RJ. (1998). A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proc Nutr Soc*, 57(2), 307-311.

Coyle P, Philcox JC, Carey LC and Rofe AM. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 59(4), 627-647.

Culotta VC, Howard WR and Liu XF. (1994). CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269(41), 25295-25302.

Charlesworth S, De Miguel E and Ordonez A. (2011). A review of the distribution of particulate trace elements in urban terrestrial environments and its application to considerations of risk. *Environ Geochem Health*, 33(2), 103-123.

Cherian MG and Apostolova MD. (2000). Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46(2), 347-356.

Cherian MG, Jayasurya A and Bay BH. (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res*, 533(1-2), 201-209.

Chomczynski P and Sacchi N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1(2), 581-585.

Chronopoulos J, Haidouti C, Chronopoulou-Sereli A and Massas I. (1997). Variations in plant and soil lead and cadmium content in urban parks in Athens, Greece. *Science of The Total Environment*, 196(1), 91-98.

Dainty SJ, Kennedy CA, Watt S, Bahler J and Whitehall SK. (2008). Response of *Schizosaccharomyces pombe* to zinc deficiency. *Eukaryot Cell*, 7(3), 454-464.

Davis RH and Perkins DD. (2002). Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. *Nat Rev Genet*, 3(5), 397-403.

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ *et al.* (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.

Deckert J. (2005). Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals*, 18(5), 475-481.

Denning DW, Hall L, Jackson M and Hollis S. (1995). Efficacy of D0870 compared with those of itraconazole and amphotericin B in two murine models of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(8), 1809-1814.

Di Croce L, Okret S, Kersten S, Gustafsson JA, Parker M, Wahli W and Beato M. (1999). Steroid and nuclear receptors. Villefranche-sur-Mer, France, May 25-27, 1999. *Embo J*, 18(22), 6201-6210.

Di Pietro A, Garcia-Maceira FI, Huertas-Gonzalez MD, Ruiz-Roldan MC, Caracul Z, Barbieri AS and Roncero MIG. (1998a). Endopolygalacturonase PG1 in Different Formae Speciales of *Fusarium oxysporum*. *Appl Environ Microbiol*, 64(5), 1967-1971.

Di Pietro A and Roncero MI. (1998b). Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact*, 11(2), 91-98.

Dignani MC and Anaissie E. (2004). Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect*, 10 Suppl 1, 67-75.

Ding C, Festa RA, Chen YL, Espart A, Palacios O, Espin J, Capdevila M *et al.* (2013). *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. *Cell Host Microbe*, 13(3), 265-276.

Ding C, Festa RA, Sun TS and Wang ZY. (2014). Iron and copper as virulence modulators in human fungal pathogens. *Mol Microbiol*, 93(1), 10-23.

Ding C, Yin J, Tovar EM, Fitzpatrick DA, Higgins DG and Thiele DJ. (2011). The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99. *Mol Microbiol*, 81(6), 1560-1576.

Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA and Eide DJ. (1994). The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269(42), 26092-26099.

do Carmo A, Costa E, Marques M, Quadrado MJ and Tome R. (2016). *Fusarium dimerum* Species Complex (*Fusarium penzigii*) Keratitis After Corneal Trauma. *Mycopathologia*, 181(11-12), 879-884.

Do E, Hu G, Caza M, Kronstad JW and Jung WH. (2016). The ZIP family zinc transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*, 54(6), 605-615.

Douglas LM, Wang HX, Keppler-Ross S, Dean N and Konopka JB. (2012). Sur7 promotes plasma membrane organization and is needed for resistance to stressful conditions and to the invasive growth and virulence of *Candida albicans*. *MBio*, 3(1).

Durbin RD. (1989). European Handbook of Plant Diseases. I. M. Smith , J. Dunez , D. H. Phillips , R. A. Lelliott , S. A. Archer. *The Quarterly Review of Biology*, 64(2), 200-200.

Ecker DJ, Butt TR, Sternberg EJ, Neeper MP, Debouck C, Gorman JA and Crooke ST. (1986). Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J Biol Chem*, 261(36), 16895-16900.

Eide DJ. (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), 711-722.

El Ghazi I, Martin BL and Armitage IM. (2010). New proteins found interacting with brain metallothionein-3 are linked to secretion. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 208634.

Emsley J. (2011). *Nature's Building Blocks*. Oxford: Oxford University Press.

Enoch DA, Yang H, Aliyu SH and Micallef C. (2017). The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods Mol Biol*, 1508, 17-65.

Esher SK, Zaragoza O and Alspaugh JA. (2018). Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 113(7), e180057.

Espart A, Marin M, Gil-Moreno S, Palacios O, Amaro F, Martin-Gonzalez A, Gutierrez JC *et al.* (2015). Hints for metal-preference protein sequence determinants: different metal binding features of the five *Tetrahymena thermophila* metallothioneins. *Int J Biol Sci*, 11(4), 456-471.

Feng W, Cai J, Pierce WM, Franklin RB, Maret W, Benz FW and Kang YJ. (2005). Metallothionein transfers zinc to mitochondrial aconitase through a direct interaction in mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun*, 332(3), 853-858.

Fogel S and Welch JW. (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(17), 5342-5346.

Fridovich I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 23, 239-257.

Fukada T and Kambe T. (2011). Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics*, 3(7), 662-674.

Galletti J, Negri M, Grassi FL, Kioshima-Cotica ÉS and Svidzinski TIE. (2015). *Fusarium* spp. is able to grow and invade healthy human nails as a single source of nutrients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(9), 1767-1772.

Garcia-Santamarina S and Thiele DJ. (2015). Copper at the Fungal Pathogen-Host Axis. *J Biol Chem*, 290(31), 18945-18953.

Garcia S, Prado M, Degano R and Dominguez A. (2002). A copper-responsive transcription factor, CRF1, mediates copper and cadmium resistance in *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem*, 277(40), 37359-37368.

Garcia Silva-Bailao M, Lobato Potenciano da Silva K, Raniere Borges Dos Anjos L, de Sousa Lima P, de Melo Teixeira M, Maria de Almeida Soares C and Melo Bailao A. (2018). Mechanisms of copper and zinc homeostasis in pathogenic black fungi. *Fungal Biol*, 122(6), 526-537.

Garnica M, da Cunha MO, Portugal R, Maiolino A, Colombo AL and Nucci M. (2015). Risk factors for invasive fusariosis in patients with acute myeloid leukemia and in hematopoietic cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 60(6), 875-880.

Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS and Alexandraki D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem*, 272(21), 13786-13792.

Georgiadou SP, Pongas G, Fitzgerald NE, Lewis RE, Rytting M, Marom EM and Kontoyiannis DP. (2012). Invasive Mold Infections in Pediatric Cancer Patients Reflect Heterogeneity in Etiology, Presentation, and Outcome: A 10-Year, Single-Institution, Retrospective Study. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 1(2), 125-135.

Gerwien F, Safyan A, Wisgott S, Hille F, Kaemmer P, Linde J, Brunke S *et al.* (2016). A Novel Hybrid Iron Regulation Network Combines Features from Pathogenic and Nonpathogenic Yeasts. *MBio*, 7(5).

Gerwien F, Skrahina V, Kasper L, Hube B and Brunke S. (2017). Metals in fungal virulence. *FEMS Microbiol Rev*, 42(1).

Gerwien F, Skrahina V, Kasper L, Hube B and Brunke S. (2018). Metals in fungal virulence. *FEMS Microbiol Rev*, 42(1).

Ghosh AK, Gupta A, Rudramurthy SM, Paul S, Hallur VK and Chakrabarti A. (2016). Fungal Keratitis in North India: Spectrum of Agents, Risk Factors and Treatment. *Mycopathologia*, 181(11), 843-850.

Giedroc DP, Chen X and Apuy JL. (2001). Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 3(4), 577-596.

Giles SS, Dagenais TR, Botts MR, Keller NP and Hull CM. (2009). Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77(8), 3491-3500.

Gordon TR. (2017). *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. *Annu Rev Phytopathol*, 55, 23-39.

Gordon TR and Martyn RD. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu Rev Phytopathol*, 35, 111-128.

Gralla EB, Thiele DJ, Silar P and Valentine JS. (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(19), 8558-8562.

Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D and Luther MF. (1998). Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(10), 2467-2473.

Grigoriev IV, Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Otilar R, Riley R *et al.* (2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D699-704.

Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, Goodstein D, Kuo A *et al.* (2012). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Res*, 40(Database issue), D26-32.

Guarro J and Gene J. (1995). Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14(9), 741-754.

Halliwell B and Gutteridge JM. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219(1), 1-14.

Hamer DH. (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem*, 55, 913-951.

Hanahan D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In Ol Press (Ed.), *DNA cloning: a Practical Approach*, Vol. 1.

Haq F, Mahoney M and Koropatnick J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*, 533(1-2), 211-226.

Hassett R, Dix DR, Eide DJ and Kosman DJ. (2000). The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 351 Pt 2, 477-484.

Hennigar SR and Kelleher SL. (2012). Zinc networks: the cell-specific compartmentalization of zinc for specialized functions. *Biol Chem*, 393(7), 565-578.

Heyneman CA. (1996). Zinc deficiency and taste disorders. *Ann Pharmacother*, 30(2), 186-187.

Hood MI and Skaar EP. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol*, 10(8), 525-537.

Huertas-Gonzalez MD, Ruiz-Roldan MC, Di Pietro A and Roncero MIG. (1999). Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54(3), 63-72.

Husaini AM, Sakina A and Cambay SR. (2018). Host-Pathogen Interaction in *Fusarium oxysporum* Infections: Where Do We Stand? *Mol Plant Microbe Interact*, 31(9), 889-898.

Iturbe-Espinoza P, Gil-Moreno S, Lin W, Calatayud S, Palacios O, Capdevila M and Atrian S. (2016). The Fungus *Tremella mesenterica* Encodes the Longest Metallothionein Currently Known: Gene, Protein and Metal Binding Characterization. *PLoS One*, 11(2), e0148651.

Jacobson ES, Goodner AP and Nyhus KJ. (1998). Ferrous iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 66(9), 4169-4175.

Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB and Beeregowda KN. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol*, 7(2), 60-72.

Jensen LT, Ajua-Alemanji M and Culotta VC. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *J Biol Chem*, 278(43), 42036-42040.

Jensen SE, Fecycz IT and Campbell JN. (1980). Nutritional factors controlling exocellular protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 144(2), 844-847.

Jiang LJ, Maret W and Vallee BL. (1998). The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 3483-3488.

Jung WH, Hu G, Kuo W and Kronstad JW. (2009). Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 8(10), 1511-1520.

Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, Kosman D and Jentsch S. (1993). MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *Embo J*, 12(13), 5051-5056.

Kagi JH and Kojima Y. (1987). Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl*, 52, 25-61.

Kagi JH and Valee BL. (1960). Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*, 235, 3460-3465.

Kagi JH, Vasak M, Lerch K, Gilg DE, Hunziker P, Bernhard WR and Good M. (1984). Structure of mammalian metallothionein. *Environ Health Perspect*, 54, 93-103.

Kambe T. (2011). An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip zinc transporters in the secretory pathway. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(6), 1036-1043.

Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A and Itsumura N. (2015). The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev*, 95(3), 749-784.

Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R and Nagao M. (2004). Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci*, 61(1), 49-68.

Karin M, Najarian R, Haslinger A, Valenzuela P, Welch J and Fogel S. (1984). Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the CUP1 locus of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(2), 337-341.

Khan AG. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol*, 18(4), 355-364.

Kim BE, Nevitt T and Thiele DJ. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol*, 4(3), 176-185.

King JC. (2011). Zinc: an essential but elusive nutrient. *Am J Clin Nutr*, 94(2), 679S-684S.

Kokkonen M, Ojala L, Parikka P and Jestoi M. (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *Int J Food Microbiol*, 143(1-2), 17-25.

Kondo Y, Rusnak JM, Hoyt DG, Settineri CE, Pitt BR and Lazo JS. (1997). Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol Pharmacol*, 52(2), 195-201.

Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM et al. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*, 9(3), 193-203.

Kuhlbrandt W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 282-295.

Kumar KS, Dayananda S and Subramanyam C. (2005). Copper alone, but not oxidative stress, induces copper-metallothionein gene in *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Lett*, 242(1), 45-50.

Kusuya Y, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T, Gono T and Takahashi H. (2017). Transcription factor Aftmac1 controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet*, 63(4), 777-789.

Labbe S, Zhu Z and Thiele DJ. (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem*, 272(25), 15951-15958.

Ladomersky E and Petris MJ. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*, 7(6), 957-964.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lane TW and Morel FM. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4627-4631.

Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC and Morel FMM. (2005). A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, 435(7038), 42-42.

Lee SJ and Koh JY. (2010). Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. *Mol Brain*, 3(1), 30.

Lenassi M, Gostincar C, Jackman S, Turk M, Sadowski I, Nislow C, Jones S *et al.* (2013). Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by de novo genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *PLoS One*, 8(8), e71328.

Leslie JF and Summerell BA. (2006). *Fusarium* laboratory workshops-A recent history. *Mycotoxin Res*, 22(2), 73-74.

Levadoux M, Mahon C, Beattie JH, Wallace HM and Hesketh JE. (1999). Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton. *J Biol Chem*, 274(49), 34961-34966.

Li L and Kaplan J. (1998). Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J Biol Chem*, 273(35), 22181-22187.

Lichten LA and Cousins RJ. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr*, 29, 153-176.

Lin X, Huang JC, Mitchell TG and Heitman J. (2006). Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the MAT α ; allele enhances filamentation. *PLoS Genet*, 2(11), e187.

Linder MC. (1991). Introduction and overview of copper as an element essential in life. (Linder, M.C., Ed), *Biochemistry of Copper*. Plenum Press, New York.

Link HF. (1809). Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. *Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin*, 3(1), 3-42.

Litvinov N, da Silva MTN, van der Heijden IM, Graça MG, Marques de Oliveira L, Fu L, Giudice M *et al.* (2015). An outbreak of invasive fusariosis in a children's cancer hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(3), 268.e261-268.e267.

Livak KJ and Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Loebus J, Leitenmaier B, Meissner D, Braha B, Krauss GJ, Dobritsch D and Freisinger E. (2013). The major function of a metallothionein from the aquatic fungus *Heliscus lugdunensis* is cadmium detoxification. *J Inorg Biochem*, 127, 253-260.

Logeman BL, Wood LK, Lee J and Thiele DJ. (2017). Gene duplication and neo-functionalization in the evolutionary and functional divergence of the metazoan copper transporters Ctr1 and Ctr2. *J Biol Chem*, 292(27), 11531-11546.

Lombard L, van der Merwe NA, Groenewald JZ and Crous PW. (2015). Generic concepts in *Nectriaceae*. *Stud Mycol*, 80, 189-245.

Lopez-Fernandez L, Ruiz-Roldan C, Pareja-Jaime Y, Prieto A, Khraiweh H and Roncero MI. (2013). The *Fusarium oxysporum* gnt2, encoding a putative N-acetylglucosamine transferase, is involved in cell wall architecture and virulence. *PLoS One*, 8(12), e84690.

Lorenzo-Gutierrez D, Gomez-Gil L, Guarro J, Roncero MIG, Fernandez-Bravo A, Capilla J and Lopez-Fernandez L. (2019). Role of the *Fusarium oxysporum* metallothionein Mt1 in resistance to metal toxicity and virulence. *Metallomics*, 11(7), 1230-1240.

Lowe J, Vieyra A, Catty P, Guillain F, Mintz E and Cuillel M. (2004). A mutational study in the transmembrane domain of Ccc2p, the yeast Cu(I)-ATPase, shows different roles for each Cys-Pro-Cys cysteine. *J Biol Chem*, 279(25), 25986-25994.

Luevano J and Damodaran C. (2014). A review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 33(3), 183-194.

Lutsenko S. (2010). Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr Opin Chem Biol*, 14(2), 211-217.

Lynes MA, Borghesi LA, Youn J and Olson EA. (1993). Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. I. Metallothionein effects on antibody production. *Toxicology*, 85(2-3), 161-177.

Lynes MA, Garvey JS and Lawrence DA. (1990). Extracellular metallothionein effects on lymphocyte activities. *Mol Immunol*, 27(3), 211-219.

Lynes MA, Zaffuto K, Unfricht DW, Marusov G, Samson JS and Yin X. (2006). The physiological roles of extracellular metallothionein. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231(9), 1548-1554.

Llorens A, Hinojo MJ, Mateo R, Gonzalez-Jaen MT, Valle-Algarra FM, Logrieco A and Jimenez M. (2006). Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int J Food Microbiol*, 106(3), 297-306.

Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, Gardiner DM *et al.* (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol*, 67, 399-416.

Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M *et al.* (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367-373.

Mackie J, Szabo EK, Urgast DS, Ballou ER, Childers DS, MacCallum DM, Feldmann J *et al.* (2016). Host-Imposed Copper Poisoning Impacts Fungal Micronutrient Acquisition during Systemic *Candida albicans* Infections. *PLoS One*, 11(6), e0158683.

Macomber L and Imlay JA. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(20), 8344-8349.

Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzocchio C and Brygoo Y. (1989). Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene*, 78(1), 147-156.

Mandal AK, Cheung WD and Arguello JM. (2002). Characterization of a thermophilic P-type Ag^+/Cu^+ -ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem*, 277(9), 7201-7208.

Maret W. (2016). The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures. *Int J Mol Sci*, 17(1).

Maret W. (2017). Zinc in Cellular Regulation: The Nature and Significance of "Zinc Signals". *Int J Mol Sci*, 18(11).

Margoshes M and Vallee BL. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, 79, 4813-4814.

Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A and Corey L. (2002). Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 34(7), 909-917.

Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL and Winge DR. (1998). Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 273(37), 23716-23721.

Marvin ME, Mason RP and Cashmore AM. (2004). The CaCTR1 gene is required for high-affinity iron uptake and is transcriptionally controlled by a copper-sensing transactivator encoded by CaMAC1. *Microbiology*, 150(Pt 7), 2197-2208.

Marvin ME, Williams PH and Cashmore AM. (2003). The *Candida albicans* CTR1 gene encodes a functional copper transporter. *Microbiology*, 149(Pt 6), 1461-1474.

Maryani N, Lombard L, Poerba YS, Subandiyah S, Crous PW and Kema GHJ. (2019). Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Stud Mycol*, 92, 155-194.

McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J et al. (2010). NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*, 12(12-13), 928-936.

McCormick NH and Kelleher SL. (2012). ZnT4 provides zinc to zinc-dependent proteins in the trans-Golgi network critical for cell function and Zn export in mammary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(3), C291-297.

Mehra RK, Garey JR, Butt TR, Gray WR and Winge DR. (1989). *Candida glabrata* metallothioneins. Cloning and sequence of the genes and characterization of proteins. *J Biol Chem*, 264(33), 19747-19753.

Merz WG, Karp JE, Hoagland M, Jett-Goheen M, Junkins JM and Hood AF. (1988). Diagnosis and successful treatment of fusariosis in the compromised host. *J Infect Dis*, 158(5), 1046-1055.

Migheli Q, Balmas V, Harak H, Sanna S, Scherm B, Aoki T and O'Donnell K. (2010). Molecular phylogenetic diversity of dermatologic and other human pathogenic fusarial isolates from hospitals in northern and central Italy. *J Clin Microbiol*, 48(4), 1076-1084.

Migocka M. (2015). Copper-transporting ATPases: The evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems. *IUBMB Life*, 67(10), 737-745.

Moreno MA, Ibrahim-Granet O, Vicente-franqueira R, Amich J, Ave P, Leal F, Latge JP et al. (2007). The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol*, 64(5), 1182-1197.

Moss M and Smith J. (1984). *The applied mycology of Fusarium*: Cambridge, British Mycological Society.

Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA and Mylonakis E. (2011). The challenge of managing fusariosis. *Virulence*, 2(2), 91-96.

Murray MG and Thompson WF. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 8(19), 4321-4325.

Nelson P, Dignani MC and Anaissie EJ. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev*, 7(4), 479-504.

Nevitt T, Ohrvik H and Thiele DJ. (2012). Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta*, 1823(9), 1580-1593.

Nguyen H, Rineau F, Vangronsveld J, Cuypers A, Colpaert JV and Ruytinx J. (2017). A novel, highly conserved metallothionein family in basidiomycete fungi and characterization of two representative *SIMTa* and *SIMTb* genes in the ectomycorrhizal fungus *Suillus luteus*. *Environ Microbiol*, 19(7), 2577-2587.

Nieboer E and Richardson D. (1978). Lichens and 'heavy' metals.

. *Int. Lichenological Newsletter*, 11(1), 1-3. .

Ninet B, Jan I, Bontems O, Lechenne B, Jousson O, Lew D, Schrenzel J *et al.* (2005). Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycoses. *Dermatology*, 210(1), 21-25.

Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, Smirnova T *et al.* (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D26-31.

Nucci M and Anaissie E. (2007). *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, 20(4), 695-704.

Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S, Voltarelli JC *et al.* (2004). *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 38(9), 1237-1242.

Nucci M, Marr KA, Vehreschild MJ, de Souza CA, Velasco E, Cappellano P, Carlesse F *et al.* (2014). Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. *Clin Microbiol Infect*, 20(6), 580-585.

O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley R *et al.* (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet Biol*, 46(12), 936-948.

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BAJ, Balajee SA, Schroers H-J, Summerbell RC *et al.* (2010). Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying Fusaria from Human and Animal Infections. *J Clin Microbiol*, 48(10), 3708.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044.

Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Pujol I and Guarro J. (2002). Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(7), 2273-2275.

Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Serena C and Guarro J. (2004a). Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 50(4), 247-251.

Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E and Di Pietro A. (2004b). *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect Immun*, 72(3), 1760-1766.

Palacios O, Espart A, Espin J, Ding C, Thiele DJ, Atrian S and Capdevila M. (2014). Full characterization of the Cu-, Zn-, and Cd-binding properties of CnMT1 and CnMT2, two metallothioneins of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* acting as virulence factors. *Metallomics*, 6(2), 279-291.

Palacios O, Pagani A, Perez-Rafael S, Egg M, Hockner M, Brandstatter A, Capdevila M *et al.* (2011). Shaping mechanisms of metal specificity in a family of metazoan metallothioneins: evolutionary differentiation of mollusc metallothioneins. *BMC Biol*, 9, 4.

Palmgren MG and Nissen P. (2011). P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*, 40, 243-266.

Palmiter RD. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8428-8430.

Park YS, Kim TH and Yun CW. (2017). Functional characterization of the copper transcription factor AfMac1 from *Aspergillus fumigatus*. *Biochem J*, 474(14), 2365-2378.

Pedersen MO, Jensen R, Pedersen DS, Skjolding AD, Hempel C, Maretty L and Penkowa M. (2009). Metallothionein-I+II in neuroprotection. *Biofactors*, 35(4), 315-325.

Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.

Plum LM, Rink L and Haase H. (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int J Environ Res Public Health*, 7(4), 1342-1365.

Powell WA and Kistler HC. (1990). In vivo rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmids. *J Bacteriol*, 172(6), 3163-3171.

Prakash A, Bharti K and Majeed AB. (2015). Zinc: indications in brain disorders. *Fundam Clin Pharmacol*, 29(2), 131-149.

Prasad AS. (2008). Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med*, 14(5-6), 353-357.

Qin Y, Dittmer PJ, Park JG, Jansen KB and Palmer AE. (2011). Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn^{2+} with genetically encoded sensors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(18), 7351-7356.

Raffa N, Osherov N and Keller NP. (2019). Copper Utilization, Regulation, and Acquisition by *Aspergillus fumigatus*. *Int J Mol Sci*, 20(8).

Ranawaka RR, Nagahawatte A and Gunasekara TA. (2015). *Fusarium* onychomycosis: prevalence, clinical presentations, response to itraconazole and terbinafine pulse therapy, and 1-year follow-up in nine cases. *Int J Dermatol*, 54(11), 1275-1282.

Rania ABA, Jabnoun-Khiareddine H, Nefzi A, Mokni-Tlili S and Daami-Remadi M. (2016). Endophytic bacteria from *Datura metel* for plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 26(8), 1139-1165.

Riddle LM, Graham TE and Amborski RL. (1981). Medium for the accumulation of extracellular hemolysin and protease by *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*, 33(3), 728-733.

Riggle PJ and Kumamoto CA. (2000). Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. *J Bacteriol*, 182(17), 4899-4905.

Rocha JD, Nascimento MT, Decote-Ricardo D, Corte-Real S, Morrot A, Heise N, Nunes MP *et al.* (2015). Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. *Sci Rep*, 5, 8008.

Roesijadi G, Bogumil R, Vasak M and Kagi JH. (1998). Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *J Biol Chem*, 273(28), 17425-17432.

Rosenzweig AC and Arguello JM. (2012). Toward a molecular understanding of metal transport by P_(1B)-type ATPases. *Curr Top Membr*, 69, 113-136.

Rutherford JC and Bird AJ. (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell*, 3(1), 1-13.

Ruttkay-Nedecky B, Nejdli L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M *et al.* (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 14(3), 6044-6066.

Sabolic I, Breljak D, Skarica M and Herak-Kramberger CM. (2010). Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 23(5), 897-926.

Saitoh Y, Izumitsu K, Morita A and Tanaka C. (2010). A copper-transporting ATPase BcCCC2 is necessary for pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Mol Genet Genomics*, 284(1), 33-43.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). Separation of RNA according to size: electrophoresis of RNA through agarose gels containing formaldehyde. In J Sambrook, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (Ed.), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. .

Sato H and Murata R. (1973). Role of zinc in the production of *Clostridium perfringens* alpha toxin. *Infect Immun*, 8(3), 360-369.

Sato M and Bremner I. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med*, 14(3), 325-337.

Schafer K, Bain JM, Di Pietro A, Gow NA and Erwig LP. (2014). Hyphal growth of phagocytosed *Fusarium oxysporum* causes cell lysis and death of murine macrophages. *PLoS One*, 9(7), e101999.

Schwartz JA, Olarte KT, Michalek JL, Jandu GS, Michel SL and Bruno VM. (2013). Regulation of copper toxicity by *Candida albicans* GPA2. *Eukaryot Cell*, 12(7), 954-961.

Seiler S and Plamann M. (2003). The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell*, 14(11), 4352-4364.

Short DP, O'Donnell K, Zhang N, Juba JH and Geiser DM. (2011). Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. *J Clin Microbiol*, 49(12), 4264-4272.

Sinclair SA and Kramer U. (2012). The zinc homeostasis network of land plants. *Biochim Biophys Acta*, 1823(9), 1553-1567.

Singh R, Gautam N, Mishra A and Gupta R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian J Pharmacol*, 43(3), 246-253.

Smith AT, Smith KP and Rosenzweig AC. (2014). Diversity of the metal-transporting P_{1B}-type ATPases. *J Biol Inorg Chem*, 19(6), 947-960.

Smith N, Wei W, Zhao M, Qin X, Seravalli J, Kim H and Lee J. (2016). Cadmium and Secondary Structure-dependent Function of a Degron in the Pca1p Cadmium Exporter. *J Biol Chem*, 291(23), 12420-12431.

Snyder WC and Hansen HN. (1940). The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.*, 27, 64–67.

Solioz M and Odermatt A. (1995). Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem*, 270(16), 9217-9221.

Soll DR, Bedell GW and Brummel M. (1981). Zinc and regulation of growth and phenotype in the infectious yeast *Candida albicans*. *Infect Immun*, 32(3), 1139-1147.

Song Y, Leonard SW, Traber MG and Ho E. (2009). Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J Nutr*, 139(9), 1626-1631.

Srivastava VK, Suneetha KJ and Kaur R. (2014). A systematic analysis reveals an essential role for high-affinity iron uptake system, haemolysin and CFEM domain-containing protein in iron homoeostasis and virulence in *Candida glabrata*. *Biochem J*, 463(1), 103-114.

Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG and Sweet MJ. (2013). Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep*, 33(4), 541-554.

Stajich JE, Harris T, Brunk BP, Brestelli J, Fischer S, Harb OS, Kissinger JC *et al.* (2012). FungiDB: an integrated functional genomics database for fungi. *Nucleic Acids Res*, 40(Database issue), D675-681.

Stuart GW, Searle PF and Palmiter RD. (1985). Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature*, 317(6040), 828-831.

Subramanian Vignesh K and Deepe GS, Jr. (2017). Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection. *Int J Mol Sci*, 18(10).

Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Porollo A, Caruso JA and Deepe GS, Jr. (2013). Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity*, 39(4), 697-710.

Sugarman B. (1983). Zinc and infection. *Rev Infect Dis*, 5(1), 137-147.

Suzuki KT, Ohnuki R and Yaguchi K. (1983). Post-mortem and *in vitro* dimerization of metallothionein in cadmium-accumulated rat liver and kidney. *Toxicol Lett*, 16(1-2), 77-84.

Suzuki KT and Yamamura M. (1980). Isolation and characterization of metallothionein dimers. *Biochem Pharmacol*, 29(5), 689-692.

Tang L, Qiu R, Tang Y and Wang S. (2014). Cadmium-zinc exchange and their binary relationship in the structure of Zn-related proteins: a mini review. *Metallomics*, 6(8), 1313-1323.

Thiele DJ. (1988). *ACE1* regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol*, 8(7), 2745-2752.

Thiers RE and Vallee BL. (1957). Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. *J Biol Chem*, 226(2), 911-920.

Thirumoorthy N, Manisenthil Kumar KT, Shyam Sundar A, Panayappan L and Chatterjee M. (2007). Metallothionein: an overview. *World J Gastroenterol*, 13(7), 993-996.

Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22), 4673-4680.

Tooley PW, Goley ED, Carras MM, Frederick RD, Weber EL and Kulda GA. (2001). Characterization of *Claviceps* species pathogenic on sorghum by sequence analysis of the β -tubulin gene intron 3 region and EF-1 α gene intron 4. *Mycologia*, 93(3), 541-551.

Torres AM, Weeden NF and Martin A. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor Appl Genet*, 85(8), 937-945.

Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, Johnson E *et al.* (2014). ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 27-46.

Trumbo P, Yates AA, Schlicker S and Poos M. (2001). Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc*, 101(3), 294-301.

Tucker SL, Thornton CR, Tasker K, Jacob C, Giles G, Egan M and Talbot NJ. (2004). A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 16(6), 1575-1588.

Tupaki-Sreepurna A and Kindo AJ. (2018). *Fusarium*: The versatile pathogen. *Indian J Med Microbiol*, 36(1), 8-17.

Upadhyay S, Torres G and Lin X. (2013). Laccases involved in 1,8-dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* are regulated by developmental factors and copper homeostasis. *Eukaryot Cell*, 12(12), 1641-1652.

Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V *et al.* (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000639.

Valls M, Bofill R, Gonzalez-Duarte R, Gonzalez-Duarte P, Capdevila M and Atrian S. (2001). A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The in vivo and in vitro metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J Biol Chem*, 276(35), 32835-32843.

van Diepeningen AD, Al-Hatmi AMS, Brankovics B and de Hoog GS. (2014). Taxonomy and Clinical Spectra of *Fusarium* Species: Where Do We Stand in 2014? *Curr Clin Micro Rpt*, 1(1-2), 10-18.

van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, van der Lee TAJ and Waalwijk C. (2015). Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Current fungal infection reports*, 9(3), 135-143.

Varon AG, Nouér SA, Barreiros G, Trope BM, Akiti T and Nucci M. (2016). Antimold Prophylaxis May Reduce the Risk of Invasive Fusariosis in Hematologic Patients with Superficial Skin Lesions with Positive Culture for *Fusarium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(12), 7290-7294.

Varon AG, Nouer SA, Barreiros G, Trope BM, Magalhaes F, Akiti T, Garnica M *et al.* (2014). Superficial skin lesions positive for *Fusarium* are associated with subsequent development of invasive fusariosis. *J Infect*, 68(1), 85-89.

Vennwald I and Wollina U. (2005). Cutaneous infections due to opportunistic molds: uncommon presentations. *Clin Dermatol*, 23(6), 565-571.

Verrier J, Bontems O, Baudraz-Rosselet F and Monod M. (2014). Oral terbinafine and itraconazole treatments against dermatophytes appear not to favor the establishment of *Fusarium* spp. in nail. *Dermatology*, 228(3), 225-232.

Viarengo A, Burlando B, Ceratto N and Panfoli I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46(2), 407-417.

Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB and Labarre J. (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 276(11), 8469-8474.

Walencik PK, Watly J and Rowinska-Zyrek M. (2016). Fungal Zinc Homeostasis - A Tug of War Between the Pathogen and Host. *Curr Med Chem*, 23(32), 3717-3729.

Watanabe M, Yonezawa T, Lee K-i, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Goto K and Hara-Kudo Y. (2011). Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 322.

Waterman SR, Hacham M, Hu G, Zhu X, Park YD, Shin S, Panepinto J *et al.* (2007). Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest*, 117(3), 794-802.

Waters BM and Eide DJ. (2002). Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem*, 277(37), 33749-33757.

Weinberg ED. (1975). Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. *Jama*, 231(1), 39-41.

Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari BZ and Kornitzer D. (2000). The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3520-3525.

Welch J, Fogel S, Buchman C and Karin M. (1989). The *CUP2* gene product regulates the expression of the *CUP1* gene, coding for yeast metallothionein. *Embo J*, 8(1), 255-260.

Wellenreuther G, Cianci M, Tucoulou R, Meyer-Klaucke W and Haase H. (2009). The ligand environment of zinc stored in vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*, 380(1), 198-203.

Wheeler MS, McGinnis MR, Schell WA and Walker DH. (1981). *Fusarium* infection in burned patients. *Am J Clin Pathol*, 75(3), 304-311.

Wickern GM. (1993). *Fusarium* allergic fungal sinusitis. *J Allergy Clin Immunol*, 92(4), 624-625.

Wiemann P, Perevitsky A, Lim FY, Shadkchan Y, Knox BP, Landero Figueora JA, Choera T *et al.* (2017). *Aspergillus fumigatus* Copper Export Machinery and Reactive Oxygen Intermediate Defense Counter Host Copper-Mediated Oxidative Antimicrobial Offense. *Cell Rep*, 19(10), 2174-2176.

Wilson W, Dahl B and Nganje W. (2018). Economic costs of *Fusarium* Head Blight, scab and deoxynivalenol. *World Mycotoxin Journal*, 11(2), 291-302.

Williams MM, Armbruster CR and Arduino MJ. (2013). Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganisms: a review. *Biofouling*, 29(2), 147-162.

Winge DR, Jensen LT and Srinivasan C. (1998). Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Curr Opin Chem Biol*, 2(2), 216-221.

Winge DR and Nielson KB. (1984). Formation of the metal-thiolate clusters of rat liver metallothionein. *Environ Health Perspect*, 54, 129-133.

Winge DR, Nielson KB, Gray WR and Hamer DH. (1985). Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem*, 260(27), 14464-14470.

Wollenweber HW and Reinking OA. (1935). Die *Fusarien*, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. *Verlag Paul Parey, Berlin, Germany*, 1-355.

Wysocki R and Tamas MJ. (2010). How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev*, 34(6), 925-951.

Xu J, Zhu Y, Ge Q, Li Y, Sun J, Zhang Y and Liu X. (2012). Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress. *New Phytol*, 196(1), 125-138.

Yamaguchi-Iwai Y, Serpe M, Haile D, Yang W, Kosman DJ, Klausner RD and Dancis A. (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of *FRE1* and *CTR1*. *J Biol Chem*, 272(28), 17711-17718.

Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T *et al.* (2007). Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol.*, 177(4), 637–645.

Yang K, Shadkchan Y, Tannous J, Landero Figueroa JA, Wiemann P, Osherov N, Wang S *et al.* (2018). Contribution of ATPase copper transporters in animal but not plant virulence of the crossover pathogen *Aspergillus flavus*. *Virulence*, 9(1), 1273-1286.

Ye B, Maret W and Vallee BL. (2001). Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2317-2322.

Youn J, Borghesi LA, Olson EA and Lynes MA. (1995). Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. II. Effects on macrophage functions. *J Toxicol Environ Health*, 45(4), 397-413.

Zangger K, Shen G, Oz G, Otvos JD and Armitage IM. (2001). Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the alpha-domain. *Biochem J*, 359(Pt 2), 353-360.

Zhang P, Zhang D, Zhao X, Wei D, Wang Y and Zhu X. (2016). Effects of *CTR₄* deletion on virulence and stress response in *Cryptococcus neoformans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(8), 1081-1090.

Zhao H and Eide D. (1996a). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6), 2454-2458.

Zhao H and Eide D. (1996b). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271(38), 23203-23210.

Zhu Z, Labbe S, Pena MM and Thiele DJ. (1998). Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J Biol Chem*, 273(3), 1277-1280.

Ziller A and Fraissinet-Tachet L. (2018). Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. *Metallomics*, 10(11), 1549-1559.



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

